

**Die kleinen nichtkodierenden RNAs im Regulon des
Zwei-Komponenten Systems CiaRH in
*Streptococcus pneumoniae***

**Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern zur
Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation**

von

Dipl.-Biol. Márta Kovács

Vorsitzender der Promotionskommission: Herr Prof. Dr. Matthias Hahn

1. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. Regine Hakenbeck

2. Berichterstatter: Herr Prof. Dr. John A. Cullum

Datum der wissenschaftlichen Aussprache:

08.05.2009

Kaiserslautern

Die vorliegende Arbeit wurde im Lehrbereich Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Kaiserslautern unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck angefertigt.

Hiermit bestätige ich, Márta Kovács, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, daß ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Kaiserslautern, den 17.03.2009

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis	1
Zusammenfassung	5
Abkürzungen	7
1. Einleitung	8
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	8
1.2 Die genetische Kompetenz und Lyse von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
1.3 Das Zwei-Komponenten System CiaRH	13
1.4 Kleine nichtkodierende RNAs	16
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	22
2. Material	23
2.1 Bakterienstämme	23
2.2 Plasmide	25
2.3 Oligonukleotide	26
2.4 Nährmedien	31
2.4.1 Das CpH8-Medium	31
2.4.2 Das THB-Medium	32
2.4.3 D-Blutagar	32
2.4.4 Das LB-Medium	33
2.4.5 Das 2xTY-Medium	33
2.5 Verwendete Antibiotika	34
3. Methoden	35
3.1 Mikrobiologische Methoden	35
3.1.1 Dokumentation des Bakterienwachstums	35
3.1.2 Anzuchtbedingungen	35
3.1.3 Stammkonservierung	36
3.1.4 Mikroskopie	36
3.1.5 Transformation von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	36
3.1.6 Kompetenz-Testung von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	37
3.1.7 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	37

3.2	Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	38
3.2.1	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	38
3.2.2	Plasmid Mini-Präparation aus <i>E. coli</i>	40
3.2.3	Plasmid Maxi-Präparation aus <i>E. coli</i>	41
3.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	41
3.2.5	Aufreinigung von PCR-Amplifikate	44
3.2.6	DNA-Konzentrationsbestimmung	44
3.2.7	DNA-Elektrophorese	45
3.2.8	DNA-Elution aus Agarosegelen	45
3.2.9	Sequenzierung von DNA	46
3.3	Arbeiten mit Ribonukleinsäuren (RNA)	47
3.3.1	Präparation von Gesamt-RNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	47
3.3.2	Aufreinigung von Gesamt-RNA	49
3.3.3	Überprüfung der Qualität von RNA	49
3.3.4	Quantifizierung und Bestimmung der Reinheit von RNA	49
3.3.5	<i>In vitro</i> Transkription von RNA	50
3.3.6	RNA-RNA Interaktionsstudien: Electrophoretic Mobility shift Assay (EMSA)	51
3.3.7	Reverse Transkription (RT-PCR)	52
3.3.8	Realtime RT-PCR	53
3.3.9	Bestimmung der 5'-Enden von mRNA durch 5'-RACE-Analyse (<u>R</u> apid <u>A</u> mplification of 5'- <u>c</u> DNA <u>E</u> nds)	55
3.3.10	Bestimmung der 3'-Enden von mRNA durch 3'-RACE (<u>R</u> apid <u>A</u> mplification of 3'- <u>c</u> DNA <u>E</u> nds)	58
3.3.11	Northern Blot-Analyse	58
3.3.12	Konstruktion der RNA Markers	60
3.4	Mikroarray-gestützte globale Transkriptomanalyse	62
3.4.1	Das Oligo-Set für <i>Streptococcus pneumoniae</i> R6	62
3.4.2	Herstellung der Mikroarray-Slides	62
3.4.3	Markierung von Gesamt-RNA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	64
3.4.4	Hybridisierung	64
3.4.5	Scannen und Analyse der Hybridisierungen	66
3.5	Klonierung von DNA-Fragmenten	67
3.5.1	Amplifikation	67
3.5.2	Restriktion	68
3.5.3	T4-DNA Polymerase Reaktion	68
3.5.4	Phosphorylierung	69
3.5.5	Ligation	69
3.6	Deletion von Genen	70
3.7	Bestimmung der Expression von Genen	71
3.7.1	Das Pneumo Promotor Probe Plasmid pPP2	71
3.7.2	Das Pneumo Translations Probe Plasmid pTP2	72
3.7.3	Das Pneumo Translations Probe Plasmid pTP3	72
3.7.4	β-Galaktosidase-Assay	73
3.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	75
3.8.1	Herstellung der Gele und Elektrophorese	75
3.8.2	Färbung der Gele	76

4.	Ergebnisse	77
4.1	Die CiaRH-regulierten intergenen Promotoren	77
4.1.1	Genetische Organisation der CiaRH-regulierten intergenen Promotoren	78
4.1.2	Detektion der von den intergenen CiaRH-regulierten Promotoren ausgehenden Transkripte mittels Northern Blot-Analyse	79
4.1.3	Detektion der csRNAs mittels Northern Blot-Analyse in RNA-Isolaten aus verschiedenen Wachstumsphasen	82
4.1.4	Bestimmung der 3'-Enden der csRNAs mittels 3'-RACE-Analyse	83
4.1.5	Lokalisation und Ausdehnung der csRNA-Gene im Genom von <i>S. pneumoniae</i> R6	86
4.2	Bioinformatische Analyse der csRNAs	88
4.2.1	Darstellung der csRNA-Faltstrukturen	88
4.2.2	Sequenzvergleich der csRNAs	92
4.3	Untersuchung der Expression der stromabwärts der csRNA-Gene lokalisierten Gene <i>ruvB</i>, <i>spr0022</i>, <i>uppS</i> und <i>gpmB</i>	93
4.3.1	Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der Gene <i>ruvB</i> , <i>spr0022</i> , <i>uppS</i> und <i>gpmB</i>	94
4.3.2	Bestätigung der CiaRH-unabhängigen Expression von <i>ruvB</i> , <i>spr0022</i> , <i>uppS</i> und <i>gpmB</i> mittels realtime RT-PCR	95
4.4	Inaktivierung der <i>ccn</i>-Gene	96
4.4.1	Konstruktion von Stämmen mit deletierten csRNA-Genen	96
4.4.2	Northern Blot-Analyse einzelner csRNAs in Stämmen, welche nur bestimmte csRNA-Gene besitzen	101
4.5	Phänotypische Charakterisierung der <i>ccn</i>-Deletionsstämme	103
4.5.1	Untersuchung des Wachstums- und Lyseverhalten der <i>ccn</i> -Deletionsstämme	103
4.5.2	Untersuchung der natürlichen Transformierbarkeit der <i>ccn</i> -Deletionsstämme	104
4.6	Suche nach den csRNA-Zielgenen	106
4.6.1	Microarray-basierte Transkriptomanalyse des Wildtyps <i>S. pneumoniae</i> R6 und von <i>S. pneumoniae</i> RK12345	106
4.6.2	Suche nach csRNA-Zielgenen anhand veränderter Proteinmengen in Gesamtzelllysaten auf SDS-Gelen	107
4.6.3	Bioinformatische Suche nach den csRNA-Zielgenen	108
4.7	Untersuchung der csRNA-vermittelten posttranskriptionellen Regulation der <i>in silico</i> ermittelten putativen Zielgene	119
4.7.1	Konstruktion des Testvektors pTP3	119
4.7.2	Klonierung der 13 Zielensequenzen in pTP3	122
4.7.3	Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität der Zielgen'-LacZ-Fusionsproteine in Abhängigkeit der csRNAs	125
4.8	Bestimmung der csRNA-abhängigen transkriptionellen- oder posttranskriptionellen Regulation von <i>comC</i>, <i>spr0081</i>, <i>cibB</i> und <i>spr1645</i>	128
4.8.1	Genetische Organisation von <i>comC</i> , <i>spr0081</i> , <i>cibB</i> und <i>spr1645</i>	129
4.8.2	Untersuchung der Promotoraktivität der <i>comC</i> , <i>spr0081</i> , <i>cibB</i> und <i>spr1645</i>	130
4.8.3	Untersuchung der posttranskriptionellen Regulation von <i>comC</i> , <i>spr0081</i> , <i>cibB</i> und <i>spr1645</i> bei Expression von ihren eigenen Promotoren	134
4.9	<i>in vitro</i>-Untersuchung der direkten Interaktion der mRNA von <i>comC</i> und <i>spr0081</i> mit den csRNAs mittels Bandshift Analyse	139

4.10	Untersuchung der Auswirkung einzelner csRNAs auf die Translation von <i>comC</i>	144
5.	Diskussion	146
5.1	Die CiaRH-regulierten intergenen Promotoren und ihre Transkripte: Die csRNAs	146
5.2	Strategien zur Auffindung der csRNA Zielgene	148
5.3	Validierung der csRNA-Zielgene <i>in vivo</i>	150
5.4	Interaktion der csRNAs mit den mRNAs ihrer Zielgene	153
5.5	Zusammenhang zwischen den CiaRH-assoziierten Phänotypen und den csRNAs	156
5.6	Ähnliche Effekte und Mechanismen in anderen Organismen	163
5.7	Ausblick	165
6.	Literaturverzeichnis	167

Zusammenfassung

Das Zwei-Komponenten System CiaRH von *S. pneumoniae* ist an der β -Laktam-Resistenz, Regulation der genetischen Kompetenz, Lyse und Virulenz beteiligt. Unter den 16 Promotoren, die von diesem System kontrolliert werden, befanden sich die fünf stärksten Promotoren in intergenen Regionen. Hieraus resultierte die Vermutung, dass diese Promotoren die Expression von kleinen nichtkodierenden RNAs steuern könnten.

Mittels Northern-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass von diesen Promotoren aus kleine RNAs mit einer Größe von 87 bis 151 Basen exprimiert werden. Im Stamm mit deletierten *ciaR* waren diese RNAs nicht bzw. kaum detektierbar. Die fünf CiaRH-abhängigen kleinen RNAs wurden csRNAs benannt (*c*ia *c*ontrolled *s*mall RNAs). Durch Northern-Analyse an vier verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums konnte gezeigt werden, dass die csRNAs in hoher Konzentration sowohl während der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase in den Zellen von *S. pneumoniae* vorhanden sind. Mittels 3'-RACE-Analyse wurde die Länge der csRNAs auf die Base genau bestimmt. csRNA1, csRNA2, csRNA3 und csRNA4 bestehen aus 87 bis 101 Nukleotiden. csRNA5 besitzt dagegen eine Länge aus 151 Basen. Die Promotoren der stromabwärts der kleinen RNAs liegenden Gene wurden mittels 5'-RACE-Analyse kartiert und ihre Expression mittels realtime RT-PCR-Analyse im Wildtyp, im *ciaR*-Deletionsstamm und einem Stamm mit aktiviertem CiaRH-System untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass diese Gene unabhängig von CiaRH exprimiert werden.

Um die Beteiligung der csRNAs an den CiaRH-assoziierten Phänotypen aufzuklären, wurden die Gene für alle fünf csRNAs deletiert und mit verschiedenen Antibiotika-Resistenz-Genen ersetzt. Durch Kombination aller Deletionen wurde der Stamm *S. pneumoniae* RK12345 konstruiert, welcher keine csRNA mehr exprimiert. In Stamm RK12345 konnte eine erniedrigte Transformationseffizienz und eine erhöhte Lyserate im Vergleich zum Wildtyp *S. pneumoniae* R6 beobachtet werden. Hierdurch wurde gezeigt, dass die csRNAs eine Rolle bei den CiaRH-regulierten Prozessen spielen.

Kleine RNAs üben ihren regulatorischen Effekt meist durch Wechselwirkung mit der mRNA ihrer Zielgene aus. Die beiden RNA-Moleküle interagieren hierbei über komplementäre Sequenzbereiche. Durch diese Basenpaarungen kommt es zur Hemmung oder Aktivierung der Translation bzw. zum Abbau des RNA-RNA-Interaktionskomplexes. Um die Ursachen der csRNA-vermittelten phänotypischen Veränderungen bestimmen zu können, wurde die Identifizierung der csRNA-Zielgene angestrebt. Mittels bioinformatischer Analyse wurde eine große Anzahl putativer Zielgene vorhergesagt, wovon nach Anlegung verschiedener Kriterien letztendlich 13 zu den weiteren Untersuchungen eingesetzt wurden. Um diese teilweise uncharakterisierten Gene auf eine posttranskriptionelle Regulation durch die csRNAs untersuchen zu können, wurde ein integratives Translations Probe Plasmid namens pTP3 konstruiert. Dieses Plasmid ermöglicht die Klonierung von 5'-Genfragmenten vor das *'lacZ*-Gen, wodurch *in frame*-Zielgen'-*'lacZ*-Fusionsproteine entstehen.

Die Expression des entstandenen Fusionsgens erfolgt hierbei von einem konstitutiven CiaRH-unabhängigen Promotor, namens P_{vegT} . Die Klonierung und Untersuchung der β -Galaktosidase-Expression der Zielgen'-lacZ-Fusionsproteine ergab, dass die klonierten Fragmente der Gene *spr0081*, *comC*, *spr1645* und *cibB* durch die csRNAs reguliert werden. Die Untersuchung dieser vier Zielgene bei Expression von den eigenen Promotoren und Intaktheit der entsprechenden mRNAs zeigte, dass letztendlich zwei Gene posttranskriptionell negativ durch die csRNAs reguliert werden. Interessanterweise ist eines dieser Zielgene das *comC*-Gen, welches für das Vorläuferpeptid des Kompetenz-Phäromons CSP kodiert. Diese Beobachtung könnte eine mögliche Ursache für die csRNA-abhängige veränderte Transformierbarkeit von Stamm RK12345 darstellen. Das zweite Zielgen der csRNAs, *spr0081*, kodiert für einen bisher uncharakterisierten ABC-Transporter, welcher möglicherweise am Transport eines Kohlenhydrats beteiligt ist. Letztendlich wurde die direkte Interaktion der *in vitro* produzierten mRNA dieser beiden Zielgene mit den csRNAs durch die Entwicklung und Etablierung einer neuartigen Methode der Bandshift-Analyse untersucht. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die mRNA von *comC* mit allen fünf csRNAs Interaktionskomplexe bildet und die mRNA von *spr0081* befähigt ist mit vier csRNAs Interaktionskomplexe zu bilden.

Schließlich wurde der Effekt einzelner RNAs auf die Expression des ComC'-lacZ-Fusionsproteins getestet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass csRNA1, csRNA2 und csRNA3 einerseits bzw. csRNA4 und csRNA5 andererseits genügen, um den Effekt aller fünf RNAs ausüben zu können. Die stärkste Hemmungsaktivität einer einzelnen csRNA konnte bei csRNA4 festgestellt werden.

Die hier vorgestellten Daten stellen nicht nur einen wichtigen Schritt zum Verständnis der Rolle der CiaRH-regulierten kleinen RNAs und den von CiaRH regulierten Prozessen dar, sondern lassen das gesamte CiaRH-System bezüglich seiner Komplexität in einem neuen Licht erscheinen. Weiterführende Untersuchungen könnten sowohl die Aufgaben der csRNAs innerhalb des CiaRH-Systems als auch die komplexe Wechselwirkung von CiaRH und den erwähnten zellulären Prozessen aufklären.

Abkürzungen

A, C, G, T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Amp	Ampicillin	Pbp	Penicillin-Bindeprotein
APS	Ammoniumpersulfat	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
aa	Aminosäure	Pos.	Position
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	RBS	Ribosomenbindestelle
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	RNA	Ribonukleinsäure
bp	Basenpaar	rpm	Umdrehungen/Minute
β-Gal-Units	β-Galaktosidase-Units	rRNA	ribosomaler RNA
cDNA	complementary DNA	RT	Raumtemperatur
CSP	Competence Stimulating Peptide	SD	Shine Dalgarno Sequenz
csRNA	cia controlled noncoding RNA	SDS	Natriumdodecylsulfat
Cy3	Cyanin-3	Ser	Serin
Cy5	Cyanin-5	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Δ	Deletion	<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
ddNTP	Didesoxynukleosid-triphosphat	<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
DEPC	Diethylen-Pyrocabonate	<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
dest.	destilliert	<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure dNTP	sRNA	small RNA
	Desoxynukleosidtriphosphat	ssDNA	einzelsträngige DNA
ds	doppelsträngig	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Tet	Tetracyclin
EDTA	Ethylendiamintetra-essigsäure	TIR	Translationsinitiationsregion
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß	Tris	Trihydroxymethyl-aminoethan
Ery	Erythromicin	tRNA	transfer-RNA
EtBr	Ethidiumbromid	U	Units
EtOH	Ethanol	ÜK	Übernachtskultur
exp. Phase	exponentielle Wachstumsphase	Vol.	Volumen
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid	v/v	Volumenprozent
		w/v	Gewichtsprozent
Kan	Kanamycin		
kb	Kilobasenpaar		
LKZ	Lebendkeimzahl		
M	Molarität		
Mg	Magnesium		
MOPS	3-Morpholino-1-propan-sulfonsäure		
mRNA	messenger-RNA		
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure		
N	Normalität		
NaAc	Natriumacetat		
Nr.	Nummer		
nt	Nukleotid		
O. D.	Optische Dichte		
ncRNA	noncoding RNA		
ONPG	o-Nitrophenol-β-D-Galactopyranosid		
ONP	o-Nitrophenol		
ORF	offenes Leseraster		

1. Einleitung

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae ist ein Gram-positives humanpathogenes Bakterium, dessen Erforschung als Krankheitserreger bis in die Anfänge der Mikrobiologie zurückreicht. Bereits 1881 wurde *S. pneumoniae* von Louis Pasteur beschrieben. 1886 konnten Fränkel und Weichselbaum zeigen, dass dieses Bakterium in den meisten untersuchten Fällen die Ursache für eine Pneumonie darstellte (Fränkel, 1886a und b; Weichselbaum, 1886). In den nachfolgenden Untersuchungen konnte es als Ursache vieler verschiedener Krankheiten identifiziert werden. Zu diesen Krankheiten zählen Lungen-, Mittelohr-, Nebenhöhlen-, und Hirnhautentzündung. Wegen der Erscheinungsform der Zellen als zwei zusammenhängende Kokken, wurde dieses Bakterium allgemein als *Diplococcus pneumoniae* bezeichnet.

Diplococcus pneumoniae stand zudem im Mittelpunkt der Versuche von Frederick Griffith im Jahre 1928. Zu dieser Zeit war bereits bekannt, dass die Polysaccharidkapsel von *S. pneumoniae* den Hauptvirulenzfaktor dieses Organismus darstellt. Er isolierte Einzelkolonien mit und ohne Kapsel. Zunächst inaktivierte er Zellen mit Kapsel und injizierte die Zellsuspensionen Mäusen. Suspensionen mit den inaktivierten, bekapselten Bakterien oder mit lebendigen, unbekapselten Bakterien verursachten keinerlei Anzeichen für eine Krankheit bei den Mäusen. Er mischte die beiden Suspensionen und injizierte sie erneut, worauf die Mäuse starben. Griffith war in der Lage, bekapselte *S. pneumoniae*-Zellen aus dem Blut der verendeten Mäuse zu isolieren. Hieraus resultierte die Vermutung über eine übertragbare Substanz, welche die Kapselbildung hervorrief. Aus heutiger Sicht stellte dieses Experiment den ersten Beweis der Transformierbarkeit von Bakterien dar. Oswald Avery führte diese Untersuchungen weiter und identifizierte im Jahre 1944 die Desoxiribonukleinsäure (DNA) als Träger der genetischen Information der Lebewesen (Avery *et al.*, 1944). Diese Arbeiten stellten bahnbrechende Grundlagen der Molekularbiologie dar.

Seit dieser Zeit wurden zahlreiche Untersuchungen an *S. pneumoniae* durchgeführt, wodurch das Wissen über diesen Organismus rasant angestiegen ist. Weltweit werden Untersuchungen zu der Pathogenität dieses Organismus durchgeführt. Bis heute sind so beispielsweise bereits über 90 Serotypen der Polysaccharidkapsel bekannt. Ein Polysaccharidimpfstoff gegen 23 Serotypen wurde bereits entwickelt.

Eine weitere Herausforderung in der Streptokokkenforschung stellt die Untersuchung der Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Antibiotika dar. Bereits kurze Zeit nach der Einführung des Penicillins konnten resistente Stämme isoliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Resistenzen durch Veränderungen des Targets des Penicillins, der Penicillin-Bindeproteine (PBPs) verursacht werden. Die hohe Anpassungsfähigkeit dieses Organismus wird durch die

Übertragung großer Genregionen zwischen den verschiedenen Spezies oder durch Anhäufung von Punktmutationen in solchen Genen, welche für die Targets der Antibiotika kodieren, verursacht. Die inter-Spezies spezifische Genübertragung ist bis heute Gegenstand vieler Forschungsarbeiten.

Immer noch befassen sich Forschungsarbeiten mit der Untersuchung des Phänomens der natürlichen Transformierbarkeit. Seit den anfänglichen Experimenten von Griffith im Jahre 1928 konnten viele Aspekte dieses Phänomens geklärt werden. Eine Veröffentlichung im Jahre 1964 von Tomasz und Hotchkiss zeigte, dass diese Eigenschaft nur während einer bestimmten Wachstumsphase auftritt (Tomasz und Hotchkiss, 1964). Daraufhin postulierten sie ein Protease-sensitives, autokatalytisches, interzelluläres Signal als Regulator der Transformierbarkeit. Diese Theorie konnte durch die Erkenntnisse der in den nachfolgenden Jahrzehnten erfolgten Untersuchungen bestätigt werden. Noch heute steht dieser Mechanismus, zusammen mit vielen anderen Fragestellungen im Blickpunkt des Interesses der molekularbiologischen Forschung bei *S. pneumoniae*.

Die Veröffentlichung der ersten beiden Genomsequenzen von verschiedenen Stämmen von *S. pneumoniae* (Hoskins *et al.*, 2001; Tettelin *et al.*, 2001) stellte einen weiteren Meilenstein in der molekularbiologischen Erforschung dieses Organismus dar. Bis heute wurden weitere 4 Genomsequenzen ermittelt und veröffentlicht. Die Sequenzierung weiterer Streptokokken, wie beispielsweise *Streptococcus mitis* und *Streptococcus oralis* (Hakenbeck, unveröffentlicht) oder *Streptococcus sanguinis* (Xu *et al.*, 2007) öffnet weitere Forschungsfelder, wie vergleichende Genomanalysen aus evolutionärer Sicht oder die Analyse inter-spezies spezifischer Genübertragung.

Systematisch gehören die Streptokokken in die Familie der Lactococcae, der Milchsäurebakterien. Allen Streptokokken fehlt die Katalase, somit können sie kein H₂O₂ reduzieren. Ein Teil der Atmungskette ist ebenfalls nicht vorhanden. Trotzdem können sie in Anwesenheit von Sauerstoff wachsen, weswegen sie auch als aerotolerante Anaerobier bezeichnet werden. Sie betreiben eine homofermentative Milchsäuregärung, wobei als Hauptprodukt Laktat entsteht.

Streptokokken benötigen komplexe Kulturmedien mit verschiedenen Vitaminen, Purinen, Pyrimidinen, Aminosäuren und Peptiden.

Die Zellen besitzen einen Durchmesser von 0,5 bis 1,5 µm und liegen paarweise oder in kurzen Ketten vor. Die Kolonien sind mit einer Größe von ca. 1 mm ebenfalls klein. Die Kolonien erscheinen leicht größer und glänzend im Fall von Vertretern mit Polysaccharidkapsel (S- (smooth) Phänotyp). Bei den meisten verwendeten Laborstämmen ist jedoch keine Kapsel mehr vorhanden, was zur sogenannten „rauen“ Koloniebildung führt (R- (rough) Phänotyp). Bereits nach einer 48-stündigen Inkubation werden in der Mitte der Kolonien Vertiefungen sichtbar, welche durch die Autolyse der Zellen entstehen. Diese den Streptokokken typische Autolyse wird durch das LytA-Enzym, einer N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase, verursacht (Höltje und Tomasz, 1976).

Streptokokken besitzen einen niedrigen GC-Gehalt von 39 % und zählen somit zum Clostridien-Zweig der Gram-positiven Bakterien. Diesem Zweig gegenüber stehen die Actinomyceten mit hohem GC-Gehalt.

Eine Möglichkeit die heterologe Gruppe von Streptokokken einzuteilen ist die Einteilung anhand ihrer Hämolyseaktivität auf Blutagarplatten. *S. pneumoniae* betreibt eine α -Hämolyse auf Blutagarplatten, wobei grünliche Zonen um die Kolonien entstehen. Die Erythrocyten lysieren hierbei jedoch nicht. Durch H_2O_2 , welches in Anwesenheit von Sauerstoff entsteht, wird lediglich Hämoglobin in Methämoglobin umgewandelt. Andere Streptokokken können eine echte Hämolyse verursachen, wobei durchsichtige Höfe um die Kolonien herum entstehen. Dieser Hämolysetyp wird als β -Hämolyse bezeichnet. Streptokokken, welche keine Hämolyse verursachen werden als γ -Hämolysierer bezeichnet. Serologisch werden die Streptokokken in Lancefield-Gruppen von A-Z bzw. ohne Gruppe unterteilt. Die Einteilung erfolgt hierbei nach der Zusammensetzung der Polysaccharide der Kapsel. Die Lancefield-Gruppen werden weiter in Serotypen eingeteilt, wovon bis heute die bereits erwähnten über 90 verschiedenen Serotypen anhand ihrer unterschiedlichen Kapselpolysaccharide identifiziert werden konnten.

1.2 Die genetische Kompetenz und Lyse von *Streptococcus pneumoniae*

Die genetische Transformation stellt einen Mechanismus zum Austausch von genetischem Material innerhalb einer Spezies aber auch des horizontalen Gentransfers über die Artgrenzen hinweg dar. In über 70 Spezies konnte bisher eine natürliche Transformierbarkeit beobachtet werden (Johnsborg *et al.*, 2007). In den meisten natürlich transformierbaren Bakterien erscheint die Kompetenz stets in der gleichen Wachstumsphase, wenn bestimmte Bedingungen vorherrschen.

In *Streptococcus pneumoniae* steht die Regulation der Kompetenz unter der Kontrolle eines quorum sensing Systems, bestehend aus einem Peptid-Phäromon, seinem Sekretions-Apparat und dem zugehörigen Zwei-Komponenten System (Claverys und Havarstein, 2002). Die Induktion der Kompetenz erfolgt durch das Peptid-Phäromon CSP (competence stimulating peptide). Das Vorläuferpeptid von CSP wird durch das *comC*-Gen kodiert. Dieses besitzt 45 Aminosäuren inklusive eines N-terminalen Doppelglycin-Leaders, welcher vor transport durch den ABC-Exporter ComA unter Beteiligung des akzessorischen Proteins ComB abgespalten wird. Das so entstandene Polypeptid besteht aus 17 Aminosäuren (Havarstein *et al.*, 1995).

Im gleichen Operon befinden sich neben *comC* die Gene *comD* und *comE*. Diese kodieren für das Zwei-Komponenten System ComDE. Die Histidin Kinase ComD perzipiert das CSP und ändert seine Konformation. Dadurch kommt es zur Autophosphorylierung des Proteins. Der Response Regulator ComE wirkt als ein transkriptioneller Regulator. Nach der Übertragung des Phosphatrests von ComD auf ComE bindet dieser an einer imperfekten Repeat-Sequenz in der Promotorregion früher

Kompetenzgene. Zu den frühen Kompetenzgenen gehören unter anderen das *comAB*- und das *comCDE*-Operon. Der phosphorylierte ComE Response Regulator aktiviert die Transkription dieser Gene. Dieses autoinduzierbare System verstärkt somit die Antwort auf das durch das CSP gesetzte Signal. Hierdurch wird mehr CSP produziert, wodurch die Menge des phosphorylierten ComE in der Zelle erhöht bleibt.

Zu den frühen Kompetenzgenen gehören zudem *comX1* und *comX2*. Diese Gene kodieren für den alternativen Sigmafaktor ComX. Ein weiteres frühes Genprodukt, das ComW, stabilisiert und aktiviert ComX (Sung und Morrison, 2005). Dieser Sigmafaktor bindet an das RNA-Polymerase Holoenzym und aktiviert die späten Kompetenzgene. Die späten Gene besitzen eine konservierte -10 Sequenz, welche als com-box oder cin-box bezeichnet wird (TACGAATA). Diese Sequenz unterscheidet sich von der -10-Region der σ^{70} -Promotoren und stellt eine typische Erkennungssequenz eines alternativen Sigmafaktors dar. Zu den späten Genen zählen Gene, welche für die DNA-Aufnahme, Prozessierung und Rekombination verantwortlich sind. Zudem finden sich unter den späten Genen auch solche Gene, deren Genprodukte eine lytische Aktivität nachgewiesen wurde oder welche für Immunitätsproteine kodieren. Weiterhin gehören viele Gene mit bislang unbekannte Funktion zu den späten Kompetenzgenen. Microarray-Analysen zeigten, dass während der kompetenten Phase 105 bis 124 Gene transkriptionell aktiviert werden (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004). Die Entwicklung der genetischen Kompetenz und einige wichtige hierbei involvierten Gene sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

Die Beobachtung, dass jedoch nur ca. 25 % der mittels Microarray-Analyse identifizierten Gene des Kompetenz-Regulons für die eigentliche Transformation benötigt werden, suggerierte, dass das *com*-Regulon noch zusätzliche Funktionen haben muss. Ein weiteres Indiz hierfür war die Beobachtung, dass die Expression der Gene des Kompetenz-Regulons auch durch Inkubation der Zellen mit sublethalen Antibiotikamengen angeschaltet werden kann (Prudhomme *et al.*, 2006). Die ComX-abhängige physiologische Phase, welche zuvor als kompetente Phase bezeichnet wurde, wurde folglich in X-State umbenannt.

Innerhalb einer Kultur, welche sich im X-State befindet, wird nur ein geringer Teil der Zellen kompetent. Diese kompetenten Zellen sondern lytische Enzyme ins Medium ab. Gegen diese Enzyme bilden sie gleichzeitig Immunitätsproteine, die einen Schutz vor der Lyse bieten. Diese lytischen Enzyme greifen die Zellwand der nichtkompetenten Zellen an, wodurch es zur Lyse und Freigabe von chromosomaler DNA ins Medium kommt. Die freiwerdende DNA kann von den kompetenten Zellen aufgenommen und ins Genom rekombiniert werden. Dieses Phänomen wurde als Allolyse, oder auch „Brudermord“ bezeichnet (Guiral *et al.*, 2005). In diesen Prozess sind die Genprodukte von sechs CSP-Abhängigen Genen involviert. Hierzu zählt das frühe Gen *comM* und die späten Gene *cbpD*, *cibA-cibB-cibC* und *lytA*. Außerdem ist ein X-state unabhängiges, durch σ^{70} -reguliertes Gen, das *lytC* involviert.

Das frühe Gen *comM* wird durch ComE reguliert und kodiert für ein Immunitätsprotein, welches Schutz vor den Murein-Hydrolasen CbpD, LytA und LytC (Havarstein *et al.*, 2006) verleiht.

Das Cholin-Bindeprotein CbpD ist eine putative Amidase/Peptidase, welche möglicherweise mit den Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren der Zellwand interagiert.

Die Genprodukte der späten Gene *cibA* und *cibB* werden, da sie jeweils einen Doppelglycin-Leader besitzen, vermutlich als inaktive Vorläuferpeptide synthetisiert und nach oder während der Prozessierung exportiert. Die prozessierten Peptide formen ein Zweipeptid-Bakteriocin. Im gleichen Operon gemeinsam mit *cibA* und *cibB* befindet sich ein drittes Gen, das *cibC*. Das Genprodukt dieses Gens ist ein kleines Membranprotein welches bisherigen Untersuchungen zufolge, als Immunitätsprotein des CibAB Bakteriocin-Systems fungiert.

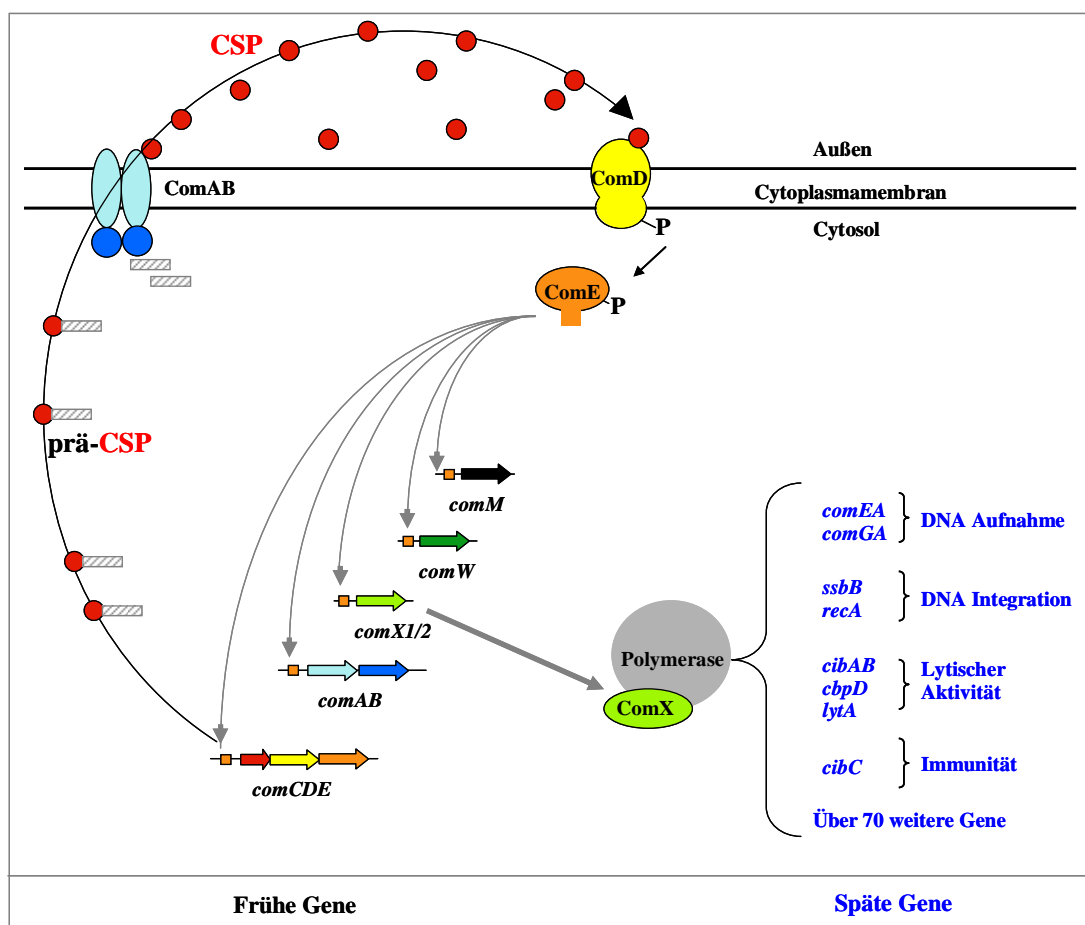


Abbildung 1.1: Regulation der Entwicklung der genetischen Kompetenz in *S. pneumoniae*. Die frühen Gene sind schwarz und die späten Gene blau dargestellt. Prä-CSP: Genprodukt von *comC* (Vorläuferpeptid des CSP); CSP: Competence stimulating peptide (prozessierte Form des *comC*-Genprodukts); ComAB: ABC-Exporter; ComD: Histidin Kinase; ComE: Response Regulator; ComM: Immunitätsprotein; ComW: ComX-stabilisierender Faktor; ComX: Alternativer Sigma-Faktor.

Das Genprodukt des *lytA*-Gens ist ebenfalls ein Cholin-Bindeprotein. LytA ist eine Amidase und löst die Peptidbrücken zwischen den einzelnen Peptidoglycansträngen auf, was die Lyse der Zellen zur

Folge hat. Bereits 1970 wurde gezeigt, dass dieses Protein die Anzahl lebensfähiger Zellen in einer stationären Kultur beeinflusst (Tomasz *et al.*, 1970). Dieses Protein ist sowohl an der Autolyse als auch an der für Streptokokken typischen Autolyse in der stationären Phase beteiligt. Dementsprechend wird es sowohl von ComX als auch von σ^{70} reguliert.

Das Lysozym LytC stellt ebenfalls ein Cholin-Bindeprotein dar. Das *lytC*-Gen wird unabhängig von ComX durch σ^{70} reguliert, ist aber für die Autolyse unabdingbar.

Ein Zusammenhang zwischen dem Zwei-Komponentens System CiaRH und der Kompetenz konnte ebenfalls gezeigt werden. Transkriptomstudien des *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*} Stammes mit aktivierten CiaRH-System zeigten, dass die Gene des Kompetenzregulons eine erniedrigte Expression aufweisen (Mascher *et al.*, 2003).

1.3 Das Zwei-Komponenten System CiaRH

Das Zwei-Komponenten System CiaRH wurde erstmals im Zuge der Charakterisierung von Cefotaxim-resistenten Labormutanten der Familie C006 identifiziert. CiaRH stellte zur damaligen Zeit eine neuartige Resistenzdeterminante dar. Als Ursache für Resistenzen gegen das β -Laktam-Antibiotikum Cefotaxim waren bis zu dieser Zeit lediglich die Penicillin Bindeproteine bekannt (Guenzi *et al.*, 1994). Zwei-Komponenten Systeme ermöglichen den Zellen, auf sich ändernde Umweltbedingungen rasch zu reagieren und die notwendigen regulatorischen Anpassungen vorzunehmen. Sie bestehen im Allgemeinen aus einer den Stimulus perzipierenden, membrangebundenen Histidin Kinase und aus einem zugehörigen, cytoplasmatischen Response Regulator, welcher meist einen transkriptionellen Regulator darstellt. Die Signalperzeption an der Histidin Kinase bewirkt deren Autophosphorylierung und die Übertragung des Phosphat-Rests auf den Response Regulator. Der phosphorylierte Response Regulator bindet an den spezifischen Bindestellen auf der DNA und reguliert die Expression der entsprechenden Gene. In *S. pneumoniae* wurden 13 Zwei-Komponenten Systeme identifiziert (Lange *et al.*, 1999; Throup *et al.*, 2000).

Das Zwei-Komponenten System CiaRH in *S. pneumoniae* ist involviert in β -Laktam-Resistenz, genetische Kompetenz, Pathogenität und Lyse. Bereits die erste Untersuchung 1994 deutete den Zusammenhang zwischen CiaRH und zwei dieser Phänotypen an. Die von Guenzi *et al.* entdeckte CiaH-Punktmutation T230P im Stamm C306 führte zur Erhöhung der Cefotaxim-Resistenz und zum Verlust der Transformierbarkeit. Die veränderte Pathogenität der *ciaRH*-Mutanten im Maus-Modell wurde ebenfalls durch verschiedene Studien gezeigt (Throup *et al.*, 2000; Paterson *et al.*, 2006). Der Zusammenhang zwischen CiaRH und der Autolyse in der stationären Phase wurde zudem eingehend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass durch Inaktivierung von *ciaR* die Autolyse zu einem früheren Zeitpunkt in der stationären Phase eintritt und die Lyserate erhöht ist. Gleichzeitig konnte eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren der Zellwandbiosynthese, wie Bacitracin und

Vancomycin festgestellt werden (Mascher *et al.*, 2006a). Dieser Stamm, *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* zeigt einen weiteren interessanten Phänotyp: Er ist transformierbar in einem Medium, in welchem der Wildtyp *S. pneumoniae* R6 nicht transformierbar ist (Mascher *et al.*, 2003; Sebert *et al.*, 2005). Somit zeigten zwei unabhängige Beobachtungen, dass CiaRH an der Regulation der genetischen Kompetenz beteiligt ist. Einerseits ist der Stamm mit aktiverem CiaRH-System, *S. pneumoniae* R6^{*ciaHC306*} nicht mehr transformierbar und andererseits ist der Stamm mit fehlenden CiaR transformierbar in einem normalerweise die Kompetenz hemmenden Medium. Die Frage, inwiefern es sich hierbei um eine direkte oder indirekte Regulation handelt, blieb bisher ungeklärt.

Die Identifizierung der CiaRH-abhängigen Gene stand im Mittelpunkt mehrerer Transkriptomstudien (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Diese Studien brachten eine große Anzahl regulierter Gene ans Tageslicht, jedoch konnten auch viele Unstimmigkeiten zwischen den Studien festgestellt werden. Ein genomweiter DNA-Bindeassay zur Auffindung der direkt durch CiaR regulierten Gene wurde ebenfalls durchgeführt (Mascher *et al.*, 2003). Dabei wurden 18 DNA-Fragmente gefunden, welche mit CiaR interagierten. Die CiaR Target-Regionen konnten folglich durch diese Studie näher eingeschränkt werden. Bandshift-Analysen einiger dieser Gene bestätigten die Regulation durch CiaR. Das für die CiaR-Bindung benötigte DNA-Bindemotiv konnte allerdings nicht identifiziert werden (Merai, 2003).

Die vergleichende Sequenz-Analyse der Gene *htrA* und *spr1149*, welche in allen Studien als reguliert vorgefunden wurden, brachte das putative CiaR-Bindemotiv ans Tageslicht (Halfmann *et al.*, 2007). Dieses Motiv befindet sich genau 10 bp stromaufwärts der -10 Regionen dieser regulierten Gene und besteht aus einer direkten Repeatsequenz von 6 bp, welche durch 5 bp voneinander getrennt vorliegen: TTTAAG-(5)-TTTAAG. Die Promotorfragmente wurden kloniert und ihre Aktivität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität in Abwesenheit des CiaR Response Regulators auf annähernd Null sinkt. Dieses Ergebnis zeigte eindeutig, dass diese Promotoren von CiaR positiv reguliert werden. Ein drittes Gen, *manL* wurde bei den zuvor erwähnten Studien als negativ reguliert beschrieben. Die Bindestelle konnte auch hier gefunden werden, wobei sie sich jedoch in der transkribierten Region auf dem entgegengesetzten DNA-Strang befand. Dieser Promotor wurde ebenfalls untersucht. Ein Anstieg der Aktivität bei fehlendem CiaR wies hier die negative Regulation durch CiaR nach. Diese Untersuchungen zeigten, dass diese Sequenz wichtig für die Bindung von CiaR an die Promotorregionen der regulierten Gene ist. Mit diesem Bindemotiv wurde die Genomsequenz von *S. pneumoniae* durchsucht. 20 potentielle CiaRH-regulierte Promotoren konnten gefunden werden. Die Untersuchung dieser Promotoren zeigte, dass 16 davon tatsächlich von CiaR reguliert werden. Von 11 dieser Promotoren wird die Expression von insgesamt 25 Genen gesteuert. Einige dieser Gene sind involviert in die Teichonsäure-Modifizierung (*lic*), den Zucker-Metabolismus (*mal*, *man*), die Stress-Antwort (*htrA*), die Chromosomen-Segregation (*parB*), Protease-Maturation (*ppmA*), sowie weitere Gene mit bislang unbekannten Funktionen.

Fünf CiaRH-abhängige Promotoren wurden in Bereichen zwischen Genen entdeckt. Diese Promotoren gehören zu den am stärksten CiaRH-regulierten Promotoren und zeigen eine starke Promotoraktivität während der gesamten Wachstumsphase (Halfmann, 2008).

Tabelle 1.1: Die durch CiaR regulierten Promotoren

CiaR-abhängige Promotoren	Genprodukte	Funktion der Genprodukte
Stark CiaR regulierte Promotoren		
P _{IG-3} (Intergen 160 bp vor spr0022)	? kleine RNA	unbekannt
P _{IG-5} (Intergen 138 bp vor spr0219)	? kleine RNA	unbekannt
P _{IG-1} (Intergen 991 bp vor spr0238)	? kleine RNA	unbekannt
P _{IG-2} (Intergen 800 bp vor spr0238)	? kleine RNA	unbekannt
P _{IG-4} (Intergen 184 bp vor spr0240)	? kleine RNA	unbekannt
P _{spr0931}	Spr0931	Konserviertes hypothetisches Protein
P _{spr2045}	HtrA ParB	Serinprotease Chromosomen Segregationsprotein
P _{spr1538a}	Spr1538a Axe	Hypothetisches Protein Acetylesterase
P _{spr1149}	Spr1149 Spr1148 LicA LicB LicC	Konserviertes hypothetisches Protein Konserviertes hypothetisches Protein Cholinkinase Transportprotein CTP: Phosphocholin Cytidyltransferase
Schwach CiaR regulierte Promotoren		
P _{spr0707}	CiaR CiaH	Response Regulator Histidin Kinase
P _{spr0782}	Spr0782	Konserviertes hypothetisches Protein
P _{spr0884}	PpmA	Peptidyl Prolyl Isomerase
P _{spr1787}	Spr1787	Konserviertes hypothetisches Protein
P _{spr1917}	MalM MalP	Amylomaltase Maltose Phosphorylase
P _{spr1982a}	DltX DltA DltB DltC DltD	Konserviertes hypothetisches Protein D-Alanyl Carrier Protein Ligase Transportprotein D-Alanyl Carrierprotein Beteiligt an Ligation Dcp-D-Alanyl
Negativ von CiaR regulierte Promotoren		
P _{spr0259}	ManL ManM ManN	Mannose / Glukose Phosphotransferase System

Unter den in der Tabelle 1.1 aufgeführten CiaRH-regulierten Genen befindet sich nur ein bekanntes Gen, das *htrA*, welches eindeutig mit den CiaRH-abhängigen Phänotypen in Zusammenhang gebracht werden konnte. Untersuchungen zu HtrA zeigten, dass diese Serinprotease eine Auswirkung auf die genetische Kompetenz von *S. pneumoniae* hat. Der Zusammenhang von *htrA* und der Kompetenz ist bisher ungeklärt. In einer Studie wurde von einer Abnahme der Transformierbarkeit der *htrA*-Deletionsmutante berichtet (Ibrahim *et al.*, 2004). Eine andere Studie beschreibt eine unveränderte Transformierbarkeit (Sebert *et al.*, 2005). In THB-Medium bleibt *S. pneumoniae* mit deletierten *htrA* nach Sebert *et al.* weiterhin nicht transformierbar, wogegen die Inaktivierung von *htrA* durch

Konstruktion eines Minigens die Rückkehr der Transformierbarkeit in THB-Medium verursachte (Schäfer, 2007). Die genaue Untersuchung dieser Wechselwirkung ist im Moment Gegenstand weiterer Untersuchungen. Ein zweites Gen unbekannter Funktion, das spr0782, scheint ebenfalls in die Regulation der natürlichen Kompetenz involviert zu sein. Manuel Heintz zeigte 2006 in seiner Doktorarbeit, dass die Deletion dieses Gens im CiaRH-aktivierten *S. pneumoniae* R6^{ciaHC306} zur Rückkehr der Transformierbarkeit führt. Diesen Transformationsphänotyp beobachtete er auch bei Deletion von *htrA* in diesem Hintergrund. Diese Daten werden ebenfalls von Miriam Müller weiter untersucht und in Zusammenhang gebracht. Die Gene des *lic*-Operons sind im Cholinmetabolismus der Teichonsäuren involviert und stellen damit wichtige Gene der Zellwandbiosynthese dar. Die Untersuchung der Funktion der einzelnen Gene ist ebenfalls Gegenstand einer Untersuchung in unserer Abteilung.

Ein weiteres Operon, welches in die Zellwandbiosynthese involviert ist, stellt das *dlt*-Operon dar. Die fünf Gene dieses Operons sind für die D-Alanylierung der Teichonsäuren zuständig. Diese Funktion wird allerdings bei *S. pneumoniae* R6, dem gegenwärtigen Laborstamm, durch eine Punktmutation in *dltA*, welche zu einem Stopcodon führt, nicht ausgeführt (Kovács *et al.*, 2006). Dementsprechend ist der Zusammenhang zwischen diesen Genen und den CiaRH-abhängigen Phänotypen in diesem Stamm kaum vorstellbar.

Die Auswirkung der in den Zuckermetabolismus involvierten *man*- und *mal*-Gene auf die genetische Kompetenz und Resistenz gegenüber Cefotaxim wurde ebenfalls von Manuel Heinz in seiner Doktorarbeit untersucht. Es konnten keinerlei Zusammenhänge zwischen diesen Genen und den untersuchten Phänotypen gefunden werden.

Von den weiteren fünf Genen spr1787, *ppmA*, spr1538a, *axe* und spr0931 konnte bisher ebenfalls kein Zusammenhang mit den CiaRH-assoziierten Phänotypen aufgedeckt werden.

Die am stärksten von CiaR regulierten Promotoren befinden sich in intergenen Bereichen. Eine Sequenzanalyse stromabwärts des +1 dieser Promotoren zeigte, dass die DNA-Sequenzen mehrere ähnliche Bereiche zueinander aufweisen. Diese Ähnlichkeit erstreckt sich bis zu 150 bp stromabwärts des +1. Die Entdeckung von DNA-Strukturen 100 bis 150 bp stromabwärts der Transkriptionsstartpunkte, welche Rho-unabhängigen Transkriptionsterminatoren ähneln, ließ die Vermutung aufkommen, dass diese Promotoren die Expression kleiner, nichtkodierender RNAs steuern.

1.4 Kleine nichtkodierende RNAs

Die Nukleinsäurezusammensetzung der Zellen prokaryotischer Lebewesen wird zu über 90 Prozent durch Ribonukleinsäure (RNA) repräsentiert. Im klassischen Sinne können drei große RNA-Klassen unterschieden werden: messenger RNAs, ribosomale RNAs und transfer RNAs. Die messenger RNAs (mRNAs) dienen als Überträger der genetischen Information zwischen DNA und Protein. Ribosomale

RNAs (rRNAs) und transfer RNAs (tRNAs) sind essentielle Funktionsträger der Proteinbiosynthese. Eine neue Klasse prokaryotischer Nukleinsäuren stellen die kleinen nichtkodierenden RNAs dar. Der erste Vertreter dieser Regulatoren, die MicF-RNA, wurde in *E. coli* bereits 1984 beschrieben (Coleman *et al.*, 1984).

In Eukaryoten sind kleine regulatorische RNAs seit relativ kurzer Zeit bekannt. Im Jahre 2001 zeigten Tuschl und seine Mitarbeiter, dass das bereits bekannte Phänomen der RNA-Interferenz durch die Anlagerung von kleinen RNAs an die Zielgen-mRNA initiiert wird (Elbashir *et al.*, 2001). Die sogenannten short interfering RNAs (siRNAs) oder microRNAs (miRNAs) sind ca. 22 Nukleotide lang und sind wichtige zelluläre Regulatoren, welche einen entscheidenden Einfluss auf die Genexpression haben. Mit Hilfe dieser RNAs können Gene spezifisch ausgeschaltet werden (zusammengefasst in Meister und Tuschl, 2004). Die Erforschung der Rolle dieser Regulatoren bei der Entstehung aber auch Behandlung verschiedener Krankheiten steht dementsprechend im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. Die Bedeutung dieser molekularen Werkzeuge wurde von der Industrie bereits erkannt. Sogenannte Gene silencer RNA-Moleküle können für einen großen Teil der für die Forschung relevanten eukaryotischen Gene käuflich erworben werden.

Die prokaryotischen kleinen RNAs haben ebenfalls bedeutende Funktion in der Regulation von Genen. Sie unterscheiden sich aber in ihrer Länge und auch durch ihre vielseitigen Wirkungsmechanismen von den eukaryotischen miRNAs. Sie besitzen eine Größe von 50 bis 400 Nukleotiden und werden small RNAs (sRNAs) oder auch noncoding RNAs (ncRNAs) genannt.

Es kann zwischen cis- und trans-kodierten kleinen RNAs unterschieden werden. Die meisten bekannten cis-kodierten RNA-Gene befinden sich auf Plasmiden, Phagen und Transposons. Diese Gene sind auf dem gleichen DNA-Abschnitt mit ihren Target-Genen auf den entgegengesetzten DNA-Strang lokalisiert. Die target-mRNAs werden sense-RNAs und die kleinen RNAs als antisense-RNAs bezeichnet. Dementsprechend sind sie komplementär zu ihrer Target-mRNA, der sense-RNA, und sind für deren Regulation verantwortlich. Meistens handelt es sich hierbei um posttranskriptionelle Regulation, vermittelt durch unterschiedliche Mechanismen, wie Inhibierung der Primerrreifung, Inhibierung der Bildung eines RNA-Pseudoknotens oder Blockierung der Ribosomenbindestelle (Brantl, 2007).

Die Gene der trans-kodierten sRNAs befinden sich in Intergenregionen. Die Komplementarität zu den Target-Genen ist relativ kurz, wodurch mehrere Gene gleichzeitig reguliert werden können. An einem gut untersuchten Beispiel, der RybB-sRNA von *Salmonella*, lässt sich das Ausmaß der Interaktion und Regulation andeuten: Die Interaktionsregion von RybB und seiner Zielgen-mRNAs ist nur 7 bis 16 bp lang. Sie reguliert die Expression von 10 Genen, welche für Porine der äußeren Membran (OMP) kodieren (Vogel, 2008).

Die Mehrzahl der bisher funktionell charakterisierten trans-kodierten kleinen RNAs sind Regulatoren der Stressantwort. Bei den meisten untersuchten Fällen führen sie eine negative posttranskriptionelle Regulation ihrer Zielgene aus. In wenigen bisher bekannten Fällen ist auch eine positive Regulation bekannt. Die bekannten regulatorischen Prinzipien von kleinen RNAs sollen an drei in *E. coli* gut untersuchten Beispielen erklärt werden. In Abbildung 1.2 sind die im Folgenden vorgestellten Mechanismen dargestellt.

Die Expression der OxyS-sRNA wird durch H₂O₂ während des oxidativen Stress induziert. Dieses bindet an *fhlA*-mRNA, welche für einen transkriptionellen Aktivator des Formiat-Metabolismus kodiert und blockiert deren Ribosomenbindestelle. Dadurch wird die Translation des Regulators reprimiert (zusammengefasst in Argaman und Altuvia, 2000).

Die RyhB-sRNA ist in den Metabolismus von Eisen involviert. Die Paarung von RyhB und *sodB*-mRNA führt zum Abbau der mRNA. RyhB wird durch den Fur-Regulator reprimiert. Der Regulator ist während ausreichender Eisenkonzentrationen im Medium exprimiert. Beim Abfall der Eisenskonzentration wird der Regulator inaktiv und die kleine RNA wird exprimiert. Die für die Eisenverwertung benötigten Gene, darunter das in Abbildung 1.2 dargestellte *sodB*, welches für eine Eisen Superoxid-Dismutase kodiert, werden jetzt durch RyhB negativ reguliert (Massé *et al.*, 2005).

Die Expression von DsrA erfolgt bei niedrigen Temperaturen. DsrA interagiert mit *rpoS*-mRNA wodurch das Gen erhöht translatiert wird. Dieses Gen kodiert für einen Sigma-Faktor σ^S , welcher in der stationären Phase aktiv ist. Bei diesem System handelt es sich um eine positive Regulation. Die Interaktion der kleinen RNA mit der mRNA führt zur Konformationsänderung der mRNA und Freigabe der Ribosomenbindestelle, wodurch die Translation erfolgen kann (Worhunsky *et al.*, 2003).

Eine weiterer vorstellbarer positiver Regulationsmechanismus wäre die Erhöhung der mRNA-Stabilität, verursacht durch die Bindung der kleinen RNAs an ihre Target-Gene. Bisher wurden keine Beispiele für diese Art der Regulation veröffentlicht.

Bei den oben beschriebenen Mechanismen sind die regulatorischen RNAs oft mit einem Protein, dem Hfq, assoziiert. Dieses Protein wirkt möglicherweise als RNA-Chaperon und bindet gleichzeitig die sRNAs und ihre Zielgen-mRNAs, wodurch die Interaktion gefördert wird. Die Wirkweise des Hfq-Proteins ist nicht genau verstanden, es wird aber von einer Bindung an AU-reiche Motive an RNAs ausgegangen (Valentin-Hansen *et al.*, 2004).

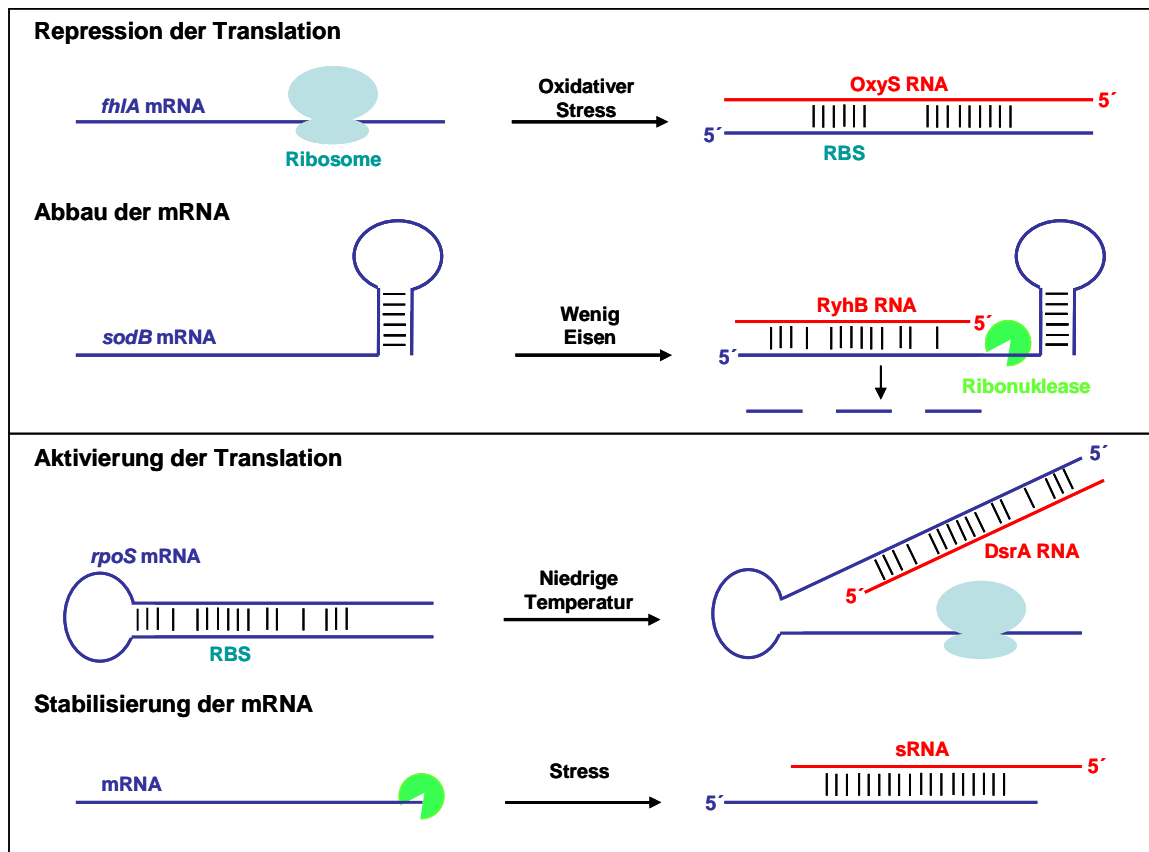


Abbildung 1.2: Regulatorische Mechanismen der sRNAs. sRNAs sind rot, mRNAs sind blau dargestellt. Die Ribosomen wurden hellblau und die Ribonukleasen grün markiert. sRNAs können ihre Zielgene durch Blockierung der Ribosomenbindestelle oder Interaktion mit anderen mRNA-Regionen und dadurch verursachten Abbau der mRNA, negativ regulieren (oberes Rechteck). Positive Regulation durch Veränderung der mRNA-Struktur und Erhöhung der Zugänglichkeit der mRNA für die Translation sind ebenfalls bekannt. Eine weitere positive Regulation durch Stabilisierung der mRNAs ist vorstellbar (unteres Rechteck).

Kleine nichtkodierende RNAs können aber nicht nur durch Interaktion mit den mRNAs, sondern auch durch Interaktion mit Regulatorproteinen regulieren. Dies wurde extensiv am CsrA (carbon storage regulator) / CsrB (sRNA)-System in *E. coli* untersucht. Das CsrA ist ein 61 aa-langes Protein und hemmt unter anderem die Glukoneogenese durch Bindung an mRNAs und Hemmung der Translation der Gene. Die CsrB-RNA ist 366 bp lang. Ihre Sekundärstruktur bildet 15 kurze Haarnadelschleifen. In 12 von diesen loop-Strukturen befindet sich das Motiv AGGA. Es konnte gezeigt werden, dass an diesen Motiven die Bindung des CsrA-Regulators mit hoher Affinität erfolgt (Ya Liu *et al.*, 1997). Durch die Bindung erfolgt eine Titration des CsrA-Regulators durch CsrB. Dies führt dazu, dass dieser seine eigentliche Funktion nicht mehr erfüllen kann. Somit kann die Translation der von ihm reprimierten Gene erfolgen (zusammengefasst in Babitzke und Romeo, 2007). Ein ähnliches System konnte in *Pseudomonas fluorescens* identifiziert werden. Hier sind allerdings 3 kleine RNAs, RsmX, RsmY und RsmZ, an der Regulation durch Komplexbildung von RsmA und dazu homologem RsmE beteiligt (Kay *et al.*, 2005).

Das mehrere kleine RNAs an der Regulation eines Gens beteiligt sein können wurde bei zwei *Vibrio*-Spezies eindrucksvoll gezeigt. In *Vibrio cholerae* wurden vier kleine RNAs identifiziert, welche an der Regulation der quorum sensing-System-vermittelten Virulenz und Biofilmbildung beteiligt sind (Lenz *et al.*, 2004). Diese RNAs, Qrr1 bis Qrr4 genannt, sind ähnlich zueinander und werden bei niedrigen Zelldichten exprimiert. Bei *Vibrio harveyi* wurde zusätzlich noch eine fünfte RNA, Qrr5, identifiziert. Die Regulation der Expression der kleinen RNAs unterliegt in beiden Organismen dem transkriptionellen Aktivator LuxO. Der phosphorylierte oder unphosphorylierte Zustand von LuxO hängt in beiden Organismen von zwei bzw. drei verschiedenen quorum sensing-Systemen ab. Bei niedrigen Zelldichten liegt dieser Regulator in phosphorylierten Zustand vor und aktiviert die Expression der kleinen RNAs. Diese hemmen wiederum die Translation des HapR- (bei *V. cholerae*) oder LuxR- (bei *V. harveyi*) Hauptregulators. Dieser Regulator hemmt die Expression von Virulenz-Genen, wie Gene für die Biofilmbildung und Gene des TypIII-Sekretionssystems. Dementsprechend entfällt die Hemmung bei niedrigen Zelldichten, womit diese Gene exprimiert werden. LuxO wirkt aber auch als Aktivator. Er reguliert positiv das Gen für die Luciferase, Gene für Proteasen sowie weitere Gene. Interessanterweise konnten in den beiden Organismen verschiedene Effekte der kleinen RNAs festgestellt werden. In *V. cholerae* wirkten die kleinen RNAs redundant: Nur die Inaktivierung aller vier RNAs führte zum Verlust der quorum sensing-Antwort. In *V. harveyi* dagegen konnte ein additiver Effekt der kleinen RNAs auf die Regulation der quorum sensing-Antwort festgestellt werden.

In grampositiven Bakterien sind bisher nur wenige kleine RNAs bekannt. Ein gut untersuchtes Beispiel, RNAIII von *Staphylococcus aureus*, wurde bereits vor 20 Jahren entdeckt. RNAIII ist ein Effektor-Molekül des *agr* quorum-sensing-Systems und reguliert indirekt positiv eine hohe Anzahl von Virulenzgenen in der Stationärphase (Geisinger *et al.*, 2006). Diese recht große RNA (514 Nukleotide) fungiert gleichzeitig auch als mRNA, indem sie für das δ -Hämolysin Hld kodiert (Janzon und Arvidson, 1990; Novick, 2003).

Die nichtkodierende kleine RNA RatA (RNA Antitoxin A) in *Bacillus subtilis* stellt ein Antitoxin dar, welches die Synthese des TxpA (toxisches Peptid A) unterdrückt. Diese beiden Gene sind in die entgegengesetzte Richtung kodiert. Ihre 3'-Enden überlappen um 75 bp (Silvaggi *et al.*, 2005).

SR1 in *Bacillus subtilis* ist am Katabolismus von Arginin beteiligt. Sie inhibiert die Translation von *ahrC*. Interessanterweise erfolgt die Interaktion mit der *ahrC*-mRNA ca. 90 bp stromabwärts der Ribosomenbindestelle.

Unter den Streptokokken wurden bisher lediglich in *Streptococcus pyogenes* kleine RNAs entdeckt. FasX besitzt eine Länge von 300 Nukleotiden und wird während der späten exponentiellen Phase exprimiert. Sie steht vermutlich unter der positiven Regulation des Response Regulators FasA und

scheint an der Regulation der extrazellulären Adhäsine und von sekretierten Virulenzfaktoren beteiligt zu sein (Kreikemeyer *et al.*, 2001).

Eine weitere regulatorische RNA stellt der *pel*-Locus dar. Dieser Locus wurde durch die Analyse einer Transposon-Genbank entdeckt und fiel durch seinen pleiotropen Effekt auf die Expression von Exoproteinen auf. Das Gen für die RNA ist 459 bp lang, wobei zwischen den Positionen 147 bis 308 bp ein weiteres Gen, *sagA*, kodiert ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die untranslatierte RNA und nicht das translatierte Produkt SagA die Expression von Virulenzfaktoren beeinflusst (Mangold *et al.*, 2004).

Die dritte bekannte kleine RNA ist RivX. Diese RNA scheint ein Prozessierungsprodukt des *rivRX*-Transkripts zu sein. Obwohl sich auch hier ein ORF auf dem Transkript befindet, konnte gezeigt werden, dass die RNA und nicht das Protein den regulatorischen Effekt auf die regulierten Gene bewirkt. Diese RNA löst einen positiven Effekt auf die Mga-regulierten Gene aus, welcher einen wichtigen Regulator der Virulenz darstellt (Roberts und Scott, 2007).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Zwei-Komponenten System CiaRH von *S. pneumoniae* spielt eine wesentliche Rolle in der Entwicklung der natürlichen Kompetenz, Lyse, Virulenz und Antibiotikaresistenz. Die direkten Zusammenhänge zwischen diesen zellulären Prozessen und den Genen des CiaRH-Regulons sind bisher unbekannt und stehen im Mittelpunkt des Interesses. In dieser Arbeit sollten die fünf neu entdeckten intergenen, durch CiaRH regulierten Promotoren und die davon ausgehenden Transkripte, die kleinen RNAs, untersucht werden.

In einem ersten Schritt sollten die Transkripte mittels Northern-Analyse nachgewiesen und die Größe der detektierten RNAs festgestellt werden. Da in der erwarteten Größenordnung kein kommerzieller Marker erhältlich ist, muss zunächst ein entsprechender RNA-Marker konstruiert werden. Um die Annotation der Gene zu ermöglichen, sollte die genaue Länge der Transkripte mittels 3'-RACE-Analyse bestimmt werden.

In einem nächsten Schritt sollte der Zusammenhang zwischen den neu annotierten Genen und deren Produkte mit den CiaRH-abhängigen Phänotypen aufgedeckt werden. Hierfür sollten die Gene deletiert und mit verschiedenen Resistenz-Kassetten ersetzt werden. Durch Kombination der Deletionen sollte schließlich ein Stamm konstruiert werden, welcher keine CiaRH-abhängigen intergenen Transkripte mehr enthält. Die anschließende phänotypische Untersuchung dieses Stammes sollte den Zusammenhang zwischen den kleinen RNAs und den CiaRH-abhängigen Phänotypen aufklären. Würde hier ein Zusammenhang festgestellt, so sollten weitere Untersuchungen über die Art der Regulation durchgeführt werden.

Eine durch kleine RNAs vermittelte Regulation erfolgt meistens posttranskriptionell durch Interaktion der kleinen RNAs und den Zielgen-mRNAs. Durch diese Interaktion erfolgt eine Aktivierung bzw. Hemmung der Translation. Um den Zusammenhang der hier untersuchten kleinen RNAs und den CiaRH-abhängigen Phänotypen näher zu beleuchten, sollte gegebenenfalls durch Microarray-, SDS-PAGE- und bioinformatische Analysen nach den Zielgenen der kleinen RNAs gesucht werden. Anschließend steht die Bestätigung der putativen Zielgene als solche im Mittelpunkt. Hierzu muss ein neues integratives Translations Probe Plasmid konstruiert werden. Dieses Plasmid sollte eine schnelle und einfache Analyse einer großen Anzahl von putativen Zielgene ermöglichen. Eine ausführliche Analyse der regulierten Gene bezüglich ihrer Promotoraktivität und Translationsstärke sollte die Art der Regulation, vermittelt durch die kleinen RNAs, aufklären.

2. Material

2.1 Bakterienstämme

In den Tabellen 2.1, 2.2 und 2.3 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Ausgangsstämme von *S. pneumoniae*

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>S. pneumoniae</i> R6	kapselfrei, kompetent;	Ottolenghi & Hotchkiss, 1962
<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>ciaR::aad9</i>	<i>ciaR::aad9</i> , Spec ^R ;	Zähner, 1999
<i>S. pneumoniae</i> R6 ^{<i>ciaHC306</i>}	nicht kompetent, CiaH T230P (<i>ciaH</i> A688C), Cef ^R	Guenzi <i>et al.</i> , 1994

Tabelle 2.2: Derivate von *S. pneumoniae* R6

Stamm	Genotyp
<i>S. pneumoniae</i> RK1	<i>ccnA::ermAM</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK2	<i>ccnB::ermAM</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12	<i>ccnA/ccnB::ermAM</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12	<i>ccnA/ccnB::ermAM</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK3	<i>ccnC::aad9</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK4	<i>ccnD::aphIII</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK5	<i>ccnE::cat</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK123	<i>ccnA/ccnB::ermAM</i> , <i>ccnC::aad9</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK45	<i>ccnD::aphIII</i> , <i>ccnE::cat</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345	<i>ccnA/ccnB::ermAM</i> , <i>ccnC::aad9</i> , <i>ccnD::aphIII</i> , <i>ccnE::cat</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK2345	<i>ccnB::ermAM</i> , <i>ccnC::aad9</i> , <i>ccnD::aphIII</i> , <i>ccnE::cat</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK1345	<i>ccnA::ermAM</i> , <i>ccnC::aad9</i> , <i>ccnD::aphIII</i> , <i>ccnE::cat</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK1245	<i>ccnA/ccnB::ermAM</i> , <i>ccnD::aphIII</i> , <i>ccnE::cat</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK1235	<i>ccnA/ccnB::ermAM</i> , <i>ccnC::aad9</i> , <i>ccnE::cat</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK1234	<i>ccnA/ccnB::ermAM</i> , <i>ccnC::aad9</i> , <i>ccnD::aphIII</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PcomC	<i>bgaA::tetM-PcomC-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 PcomC	<i>ccnA/ccnB::ermAM</i> , <i>ccnC::aad9</i> , <i>ccnD::aphIII</i> , <i>ccnE::cat</i> , <i>bgaA::tetM-PcomC-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T2comC	<i>bgaA::tetM-T2comC-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T2comC	<i>ccnA/ccnB::ermAM</i> , <i>ccnC::aad9</i> , <i>ccnD::aphIII</i> , <i>ccnE::cat</i> , <i>bgaA::tetM-T2comC-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T3comC	<i>bgaA::tetM-T3comC-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T3comC	<i>ccnA/ccnB::ermAM</i> , <i>ccnC::aad9</i> , <i>ccnD::aphIII</i> , <i>ccnE::cat</i> , <i>bgaA::tetM-T3comC-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T3spr0081	<i>bgaA::tetM-T3spr0081-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T3spr0081	<i>ccnA/ccnB::ermAM</i> , <i>ccnC::aad9</i> , <i>ccnD::aphIII</i> , <i>ccnE::cat</i> , <i>bgaA::tetM-T3spr0081-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T2spr0081	<i>bgaA::tetM-T2spr0081-B-lacZ</i>

<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T2spr0081	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-T2spr0081-B-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 Pspr0081	<i>bgaA::tetM-Pspr0081-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 Pspr0081	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-Pspr0081-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T3spr1645	<i>bgaA::tetM-T3spr1645-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T3spr1645	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-T3spr1646-1645-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T2spr1646-1645	<i>bgaA::tetM-T3spr1646-1645-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T2spr1646-1645	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-T2spr1646-1645-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 Pspr1646-1645	<i>bgaA::tetM-Pspr1646-1645-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 Pspr1646-1645	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-Pspr1646-1645-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T3cibB	<i>bgaA::tetM-T3cibB-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T3cibB	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-T3cibB-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T2cibA-cibB	<i>bgaA::tetM-T2cibA-cibB-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T2cibA-cibB	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-T2cibB-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 PcibABC	<i>bgaA::tetM-PcibABC-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 PcibABC	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-PcibABC-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T3comA	<i>bgaA::tetM-T2comA-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T3comA	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-T2comA-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T3spr0231	<i>bgaA::tetM-T3spr0231-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T3spr0231	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-T3spr0231-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T3spr0265	<i>bgaA::tetM-T3spr0265-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T3spr0265	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-T3spr0265-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T3spr0791	<i>bgaA::tetM-T3spr0791-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T3spr0791	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-T3spr0791-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T3spr0822	<i>bgaA::tetM-T3spr0822-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T3spr0822	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-T3spr0822-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T3spr1610	<i>bgaA::tetM-T3spr1610-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T3spr1610	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-T3spr1610-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T3blpY	<i>bgaA::tetM-T3blpY-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T3blpY	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-T3blpY-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> R6 T3spr1932	<i>bgaA::tetM-T3spr1932-lacZ</i>
<i>S. pneumoniae</i> RK12345 T3spr1932	<i>ccnA/ccnB::ermAM, ccnC::aad9, ccnD::aphIII, ccnE::cat, bgaA::tetM-T3spr1932-lacZ</i>

Tabelle 2.3: *E. coli* Stamm

Stamm	Merkmale	Referenz
DH5 α	Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 D(<i>lacZYA-argF</i>) <i>recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 phoA relA1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989

2.2 Plasmide

In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide zusammengestellt. In der Tabelle 2.5 sind die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide verzeichnet.

Tabelle 2.4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Selektionsbedingungen	Referenz
pUC19	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pPP2vegW	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Halfmann, Doktorarbeit 2008
pPP2	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Halfmann <i>et al.</i> , 2007a
pTP2	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Kovács <i>et al.</i> , 2006
pTP3	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>	Diese Arbeit

Tabelle 2.5: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Bemerkungen	Selektionsbedingungen
pTP3comA	pTP3 Derivat; besitzt <i>comA</i> - <i>translations-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP3spr0791	pTP3 Derivat; besitzt <i>spr0791</i> - <i>translations-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP3spr1610	pTP3 Derivat; besitzt <i>spr1610</i> - <i>translations-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP3comC	pTP3 Derivat; besitzt <i>comC</i> - <i>translations-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP3spr0081	pTP3 Derivat; besitzt <i>spr0081</i> - <i>translations-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP3cibB	pTP3 Derivat; besitzt <i>cibB</i> - <i>translations-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP3spr0231	pTP3 Derivat; besitzt <i>spr0231</i> - <i>translations-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP3blpY	pTP3 Derivat; besitzt <i>blpY</i> - <i>translations-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP3spr0822	pTP3 Derivat; besitzt <i>spr0822</i> - <i>translations-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP3spr1932	pTP3 Derivat; besitzt <i>spr1932</i> - <i>translations-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP3spr0265	pTP3 Derivat; besitzt <i>spr0265</i> - <i>translations-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP3spr1645	pTP3 Derivat; besitzt <i>spr1645</i> - <i>translations-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP3spr1927	pTP3 Derivat; besitzt <i>spr1927</i> - <i>translations-lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 μ g/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 μ g/ml in <i>S. pneumoniae</i>

pTP2comC	pTP2 Derivat; besitzt P_{comC} - <i>comC</i> -translations- <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP2spr0081	pTP2 Derivat; besitzt $P_{spr0081}$ - <i>spr0081</i> -translations- <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP2cibAB	pTP2 Derivat; besitzt P_{cibABC} - <i>cibAB</i> -translations- <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pTP2spr1646-1645	pTP2 Derivat; besitzt $P_{spr1646-1645}$ - <i>spr1646-spr1645</i> -translations- <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2comCDE	pTP2 Derivat; besitzt P_{comC} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2cibABC	pTP2 Derivat; besitzt P_{cibABC} - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2spr0081-0082-0083	pTP2 Derivat; besitzt $P_{spr0081-spr0082}$ - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>
pPP2spr1646-1645	pTP2 Derivat; besitzt $P_{spr1646-1645}$ - <i>lacZ</i> Fusion	Ampicillin 100 µg/ml in <i>E. coli</i> ; Tetracyclin 3 µg/ml in <i>S. pneumoniae</i>

2.3 Oligonukleotide

Die Tabellen 2.6 bis 2.16 zeigen die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Oligonukleotide. Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Ebersberg und Operon Biotechnologies hergestellt. Die Stammlösungen hatten eine Konzentration von 100 pmol, gelöst in 1xTE-Puffer. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Gebrauchslösungen wurden als 1:10-Verdünnungen in H₂O angesetzt.

Tabelle 2.6: Oligonukleotide zur Konstruktion der csRNA Inaktivierungsstämme

Oligonukleotid	Sequenz (5'→ 3')
236K	GACAAGGCGACTGGTAAGGCTTTGG
237tag5	GCGGCGGCCTGCCGCGGCGGTATTTTTTACGATTCATCCAAGTCATCCC
tag3interF	CGACGACGACGACGACGACGAGGTCGGGGAATTGGCGGGGAC
ruvK	CCGACGTCTGCTTAAGATTGACTCCC
ermAMfor	CCGCCGCGGCAGGCCCGCCGAGCAAGAATGGCGGAAACG
ermAMrev	AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCCTTTAGTAACGTGTAACCTTCC
236F	GCTAAGGGGTACACGGATAGGAAGTGAAGC
ruvR1	GCACATGATCCAGCGCTTCATCCCCG
RNA1tag3	CGACGACGACGACGACGACGAGTTATTTTTTACGATTCATCCAAGTCATCCC
RNA1tag5	GCGGCGGCCTGCCGCGGCGGAGGTGCTGGTGATAGAAATTTTTTGC
RNA2tag5	GCGGCGGCCTGCCGCGGCGGCAAAAAATTTCTATCACCAGCACCTC
purK1	CGACAATAAGATTGGTACGAC
purR	CGATCGATCGAAAAATCTCTTAGGACCAAACACTTTC
22F1	GACGCTAGCGAGTCACCGCATTCGGTGGC
dut1	CTGGCGCAACAACTGTACG
aad9_1	ATCGATTTTCGTTTCGTGAA
aad9_2	CCAATTAGAATGAATATTCCC
uppS5	CCAATCCGCTACGGGCACG

uppS2C	CCATTTATTATTTTCCTTCCTCTTTTCCTTAAGTATTTTAAAAATCAAATTTTCC
uppS3B	CTACAAGCTTTTGTAGACATCTAAATCTTTTTTGA AAAATGGGCTTGG
uppS6	GGCTAGCATGGCTACGATTC
aph1A	GGAAAAATTTGATTTTAAAAATACTTAAGGAAAAGAGGAAGGAAATAATAAA TGG
aph2	CCAAGCCCATTTTTCAAAAAAAGATTTAGATGTCTAAAAAGCTTGTAG
uppS1	GGAGTATTATGCCCATGCTGAC
uppS4	CGATTGCTATCTGAAGCAAGAGG
Cat1	GATATAATTTGCAAACGTAAATTTAGGAGGAATTTATATATGAC
Cat2	GGCGCATGCACAAAAAATGGACTGAACAAGTCAG
Veg5	GGCGCATGCTTGGACTCCTGTTGATAGATC
PVeg2	CCTCCTAAATTACAGTTTGCAAATTATATCATATTAATAAGACG
gpmB5	GCTGAGTTGGGAATTCCTATC
gpmB2	GGCGCATGCGAACTTAAAATTTCTCCTATTTTC
gpmB3	GGCGCATGCGAACTTAAAATTTCTCCTATTTTC
gpmB6	GCATGCCATTAATCAGATAAAC
gpmB1	GACACCTATTTCTCTGATTG
gpmB4	GGTTCCAATAGTCATTCCATGG

Tabelle 2.7: Oligonukleotide zur Überprüfung der Klonierungen in pPP2, pTP2 und pTP3, sowie zur Bestätigung der korrekten Integration in das Genom von *S. pneumoniae* R6

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
EII_fwd_Kontr	GATATCTGGCACTTGTCTATCACAGG
tetM_rev_Kontr	ATCTTTCACGGGCATATAACGATGC
lacZ_fwd_Kontr	CGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTG
bgaA_rev_Kontr	GGGATTGGTACTTATGGCCAATAACC
MCS_fwd_Kontr	GCGACATTCACGATTACTTGGC
274_lac	GGAAGGGCGATCGGTGCGGG

Tabelle 2.8: Oligonukleotide für die Bestimmung von Transkriptionsstartpunkten mittels 5'-RACE-Analyse

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
5'RACE-Adapter	GAUAUGCGCGAAUCCUGUAGAACGAACACUAGAAGAAA
RACE_PCR_5'	GATATGCGCGAATTCCTG
rufB_RT_RACE	CACGTAAATACTGAGGACGG
rufB_RACE_3'	CGTTCTACTAACTCCTCATC
gpmB_RT_RACE	GAATCCCTCGTTCACCTTCAG
gpmB_RACE_3'	GAGTATCGCTCCAACCTTGC
uppS_RT_RACE	CATTGCCATCCATGATGATGC
uppS_RACE_3'	CTGTGTCGGAACCTCTACTTC
spr022_RT_RACE	CATTATGCCCACGACCAATG
spr022_RACE_3'	CATCTTTGACAATCACACAACC
spr0081_RACE_3'	GGAATGTAAAAGAATAGAATCAACCAGAGTGC
spr0081-RT-RACE	GTCTTTGAAGGCAACCACGTTCCCAAATAC
cibB_RACE_5'	CCTTATTAGAAATTTACGATAG

cibB_RT_RACE	CACCTACACCAAAGCCACCCTTGATTTC
Spr1646_RT-RACE	GGTAATTCTCTATAACGTGATTG
Spr1646_RACE_5	GATTGCTACAACGTATTCC

Tabelle 2.9: Oligonukleotide für die Bestimmung von Transkriptenden mittels 3'-RACE-Analyse

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
3' RACE-Adapter	5'-phosphat- UUUCUUCUAGUGUUCGUUCUACAGGAAUUCGCGCAUAUC
RNA1_RACE_5	ATTAAATAAAGACCTCCTAAC
RNA1-RACE5a	ATTAAATAAAGACCTCCTAACTTTATTTAATAAAATCC
RNA1-RACE5b	GACCTCCTAACTTTATTTAATAAAATCC
RNA3_RACE_5	GGTTACAAGAAGACCTCC
RNA4_RACE_5	ATAAGTTAAGAAGACCTTAAC
RNA5_RACE_5	GACCTCCTAATATTATTTGAAAC

Tabelle 2.10: Oligonukleotide für die Amplifikation der in das Plasmid pUC19 klonierten Fragmente

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
ucR	AGCGGATAACAATTCACACAGGA
ucF	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC

Tabelle 2.11: Oligonukleotide für die Bestimmung von Transkriptmengen mittels realtime PCR

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
rtime_gpmB1	TGCGAGAATCTGATCTACAGTTTG
rtime_gpmB2	TACCGAAACACCATCTCTGATAC
rtime_ruvB1	GTGGAAGAGGTGCTTTATAGTG
rtime_ruvB2	TAGCGGATTGGAGAGCATAC
rtime_237°	AGCAGGCCTTATCTCATTTCATTAG
rtime_237B	TACCAATTCCTTGACGCTGATAG
rtime_022°	TTTATGAGGGAGGCTTTGAGAG
rtime_022B	ATTTCCGCATGCATAACCG
rtime_uppS1	CACAGGTTCTGCTCATATCG
rtime_uppS2	TAACCTTGACGCCCAGTTTG
RTgyrAf	TATCACAGCAGTACGTGATGAG
RTgyrAr	GGATAGCGAGCATATTGAAACC

Tabelle 2.12: Oligonukleotide für die Konstruktion des RNA-Markers

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
PBluescript_fwd	CAGGACTATAAAGATACCAG
pBluescript_1	GAATTCCTGCAGCCCGG
pBluescript_2	GAGGTCGACGGTATCG
pBluescript_3	CAATTAACCCTCACTAAAGG
pBluescript_4	ATAACAATTTACACAGGAAAC

Tabelle 2.13: Zur Northern Blot-Analyse verwendete Digoxigenin-Markierte Sonden

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
Sonde_csRNA1 und 2	5' DIG-AAAAGTTTAGGATTTTATTAAATAAAGTTAGGAGGTCTTTATTTAAT
Sonde_csRNA3	5' DIG-AAGTTTAGGATATTTGTTACAACAAGTTAGGAGGTCTTCTTGTAACC
Sonde_csRNA4	5' DIG-ATTATGAAAAAGTTTTAGGAGTTTAAGTTAAGGTCTTCTTAACCTAT
Sonde_csRNA5	5' DIG-ATTCAGTGTTATCTGTTTCAAATAATATTAGGAGGTCTTTATTTAAT
Sonde_htrA	5' DIG-GTAAAATGTTTTTAGATGTTTCATATTTGCCTCCATATGTTTGAATT
Sonde_comC	5' DIG-TTCATAATAAAATCTCCTAAAATGTTTTTCTTGTAAGCTAACTTAC
Sonde_Marker	5' DIG-ATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAATTCGCCC

Tabelle 2.14: Oligonukleotide für die *in vitro* Transkription

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
pBlue-ccnAB-2	TAATACGACTCACTATAGGATTAAATAAAGACCTCCTAAC
pBlue-ccnB-3	AAAAAACTCCACCTGATTG
pBlue-ccnA-3	AAAAAAGCCACCTGATTGGG
pBlue-ccnC-2	GCGTAATACGACTCACTATAGGTTACAAGAAGACCTCCTAACTTG
pBlue-ccnC-3	AAAAAAAGCCACCGAATGCGG
pBlue-ccnD-2	TAATACGACTCACTATAGGATAAGTTAAGAAGACCTTAAC
pBlue-ccnD-3	AAAAAAATAAGCCGCCTGATTGG
pBlue-ccnE-2	TAATACGACTCACTATAGGATTAAATAAAGACCTCC
pBlue-ccnE-3	AAAATAAAAGCCACCCATACAG
pBlue-htrA-2	TAATACGACTCACTATAGGAATTCAAACATATGGAGGC
pBlue-htrA-3	TACTATTGTTGTTAGAGTTGTTTAC
pBlue-comC-2	CGTAATACGACTCACTATAGTAAGTTAGCTTACAAGAAAAACATTTTAGG
pBlue-comC-3	TTACTTTTTTCTTTGTAAAAATAAAATCACG
pBlue-spr0081-1	TAATACGACTCACTATAGGTAATCGTTATCAAAAGTCTAAAAAAG
PBlue-spr0081-2	CCAAATACTGGAATGTAAAAGAATAG

Tabelle 2.15: Oligonukleotide für die Herstellung des Plasmids pTP3 und für die Klonierung der Zielgene in pTP3

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
vegW-PmeI-BamHI	GCGGGATCCTACGTACGTTTAAACAAATTATATCAAGTTAATAAGACG
Veg5	GCATGCTTGGACTCCTGTTGATAGATC
0081-for	AAAAAGGGAGGAAATTATGAAAAAGTTTTCA
0081-rev	GATCTGAAAACTTTTTCATAATTTCCCTCCCTTTTT
cibB-for	TTAGGAGGAGATTAATATGATGAAAAATTTGAACAAC
cibB-rev	GATCGTTGTTCAAATTTTTTCATCATATTAATCTCCTCCTAA
spr0231-for	AAAAGGAGATTTATTATGGCAAAGATGGATGTTCAAGAAATCATT
spr0231-rev	GATCAATGATTTTCTGAACATCCATCTTTGCCATAATAAATCTCCTTTT
spr0265-for	AGGAGATAGGTGATGAAAGAGAAAAAT
spr0265-rev	GATCATTTTTCTCTTTCATCACCTATCTCCT
BlpY-for	TGAGGGAGGATTTCTATGAAAAAGTAT
BlpY-rev	GATCATACTTTTTCATAGAAATCCTCCCTCA
Spr0791-for	AAGTAGAGAGGTGGCTGTATGAAAAAGTGAAGTTGGGGGAAGTCTTA
Spr0791-rev	GATCTAAGACTTCCCCCACTTCACTTTTTTTCATACAGCCACCTCTCTACTT

Spr0822-for	AGACTTTAAAGGGAGATTATCATGATGGACAGTCCAAAAAATTAGGCTAT
Spr0822-rev	GATCATAGCCTAATTTTTTTGGACTGTCCATCATGATAATCTCCCTTTAAAG TCT
Spr1610-for	TTGGAGGTGTTATGAAGAAAATTGGGACTTAT
Spr1610-rev	GATCATAAGTCCCAATTTTCTTCATAACACCTCCAA
ComA-2	GGCGGATCCACGTTTCCCAAATTCATATTCATCTCC
ComA-3	ATCAGATGAGTTTATACTCTTCG
Spr1932-for	TCTTGATGTAGAACTTAGAACAAGGAGGGAGATTATCTATGAACTATTGT TTAGA
Spr1932-rev	GATCTCTAAACAATAGTTTCATAGATAATCTCCCTCCTTGTTCTAAGTTCTA CATCAAGA
Spr1645-for	AAAAAAGGAGAAGCTTATCATGAAAAAATGAAAGTTTGGTCT
Spr1645-rev	GATCAGACCAAAGCTTCATTTTTTTTCATGATAAGTTCTCCTTTTTT
comC+1	GTAAGTTAGCTTACAAGAAAAAAC
comC-Transl-Fus- lang	CGGGATCCAAAGCTACAAAGCTGTTCCAATTAAAC
spr1927-for	AAAAAGGAGAATGAATATGAAAAAGAAACGTAGATTGTTA
spr1927-rev	GATCTAACAATCTACGTTTCTTTTTCATATTCATTCTCCTTTTT

Tabelle 2.16: Oligonukleotide für die Klonierung von *comC*, *spr0081*, *cibB* und *spr1645* ins pPP2 und pTP2

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
comC-Transl-Fus-lang	CGGGATCCAAAGCTACAAAGCTGTTCCAATTAAAC
comC+1	GGCGTAAGTTAGCTTACAAGAAAAAAC
ComC1	GCATGCTGGGATCAATATAATAGCAAAGCTGGG
ComC4	GGATCCACTGTGTTTTTCATAATAAAATCTCC
Spr0081-1	GGCGCATGCCATTTGTTTGATAGTGGTGATAAAG
Spr0081-2	GGCGGATCCGATATCCATCTAAAAATTCTTTTTTAGAC
Spr0081-3	GGCGGATCCTGAAAAGCTTTTTCATAATTCCTCC
CibB_1	GGCGCATGCAGACAAGAGTGCCCTCACTTAAC
CibABC-Promotor	GGCGGATCCCTTGTTCACTTTTATATTCGGAAAAG
CibA_2	GGCGGATCCGATTGTCAAGAATGTCAAAATTTGTC
CibB_2	GGCGGATCCGTTGTTCAAAATTTTCATCATATTAATC
Spr0081-A	GGCGGATCCTTGATATCCATCTAAAAATTCTTTTTTAGAC
Spr0081-B	GGCGGATCCGTTTTTGAAAAGCTTTTTCATAATTCCTCC
Spr0081-Promotor	GGCGGATCCTACATTATTAGTATACTCCTATTTGC
Spr0081-1	GGCGCATGCCATTTGTTTGATAGTGGTGATAAAG
Spr1645-1	GGCGCATGCGATGATACTGTCTATATGAGTGCTG
Spr1645-2	GGCGGATCCACAGTAGACCAAAGCTTCATTTTTTTCATG
Spr1646-1645-Promotor	GGCGGATCCGTCACATGTTTACATTATACAATGAAACC

2.4 Nährmedien

2.4.1 CpH8-Medium (C-Medium) zur Kultur von *Streptococcus pneumoniae*

In allen in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden die *Streptococcus pneumoniae* Stämme in CpH8-Medium (Lacks & Hotchkiss, 1960) angezogen. Die einzelnen Komponenten dieses Mediums wurden separat hergestellt und erst bei Bedarf zusammenpipettiert. Die Lagerung der Einzelkomponenten erfolgte bei 4°C unter Lichtausschluß.

Tabelle 2.17: Zusammensetzung des CpH8-Mediums

Komponente	Menge [ml]
PreC	400
Supplement	13
Glutamin [1 mg/ml]	10
Adams III	10
Pyruvat 2 %	5
Phosphatpuffer	15
Hefeextrakt 5 %	9
Endvolumen	462

Tabelle 2.18: Zusammensetzung der Einzelkomponenten

Komponente	Zusatz	Menge
PreC	Na-Acetat, wasserfrei	1,2 g
	Casaminoacids	5 g
	L-Tryptophan	5 mg
	L-Cystein	50 mg
	H ₂ O	ad 1000 ml
	pH 7,5 einstellen, autoklavieren	
Supplement	3in1-Salze	60 ml
	Glucose 20 % (w/v)	120 ml
	Saccharose 50 % (w/v)	6 ml
	Adenosin [2 mg/ml]	120 ml
	Uridin [2 mg/ml]	120 ml
	Komponenten einzeln autoklavieren, steril zusammenpipettieren	
Adams III	Adams I	160 ml
	Adams II	40 ml
	Asparagin	2 g
	Cholinchlorid	0,2 g
	CaCl ₂ [0,1 M]	1,6 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
	Sterilfiltrieren und unter Lichtausschluß lagern	
Phosphatpuffer pH8	KH ₂ PO ₄ [1 M]	53 ml
	K ₂ HPO ₄ [1 M]	947 ml
	Autoklavieren	

3in1-Salze	MgCl ₂ x6H ₂ O	100 g
	CaCl ₂ , wasserfrei	0,5 g
	MnSO ₄ x4H ₂ O [0,1 M]	0,2 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
	Autoklavieren	
Adams I	Biotin	0,5 g
	Nicotinsäure	150 mg
	Pyridoxin-HCl	175 mg
	Ca-Pantothenat	600 mg
	Thiamin-HCl	160 mg
	Riboflavin	70 mg
	H ₂ O	ad 1000 ml
	Sterilfiltrieren und unter Lichtausschluß lagern	
Adams II	FeSO ₄ x7H ₂ O	500 mg
	CuSO ₄ x5H ₂ O	500 mg
	ZnSO ₄ x7H ₂ O	500 mg
	MnCl ₂ x4H ₂ O	200 mg
	HCl _{konz.}	10 ml
	H ₂ O	ad 1000 ml
	Sterilfiltrieren und unter Lichtausschluß lagern	

2.4.2 Todd-Hewitt-Medium (THB)

Todd-Hewitt-Medium ist ein für Pneumokokken oft verwendetes Komplexmedium, welches gebrauchsfertig bezogen wurde (Difco, Detroit, USA). Das Medium wurde nach Herstellerangaben angesetzt und autoklaviert.

Tabelle 2.19: Zusammensetzung des Todd-Hewitt-Mediums

Komponente	Menge
Rinderherz (Infusion von Frischgewebe)	3,1 g
Pepton	20 g
Glucose	2 g
NaCl	2 g
Natriumcarbonat	2,5 g
Dinatriumphosphat	0,4 g

2.4.3 D-Blutagar

Als Festmedium zur Kultur von *Streptococcus pneumoniae* wurde D-Blutagar verwendet. Hierzu wurde D-Agar autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 48°C mit defibriniertem Schafsblut (Oxoid) zu einer Endkonzentration von 3% (v/v) versetzt. Nach Zugabe eventueller Zusätze, wie Antibiotika, wurde gemischt und in sterile Petrischalen gegossen.

Tabelle 2.20: Zusammensetzung des D-Blutagars

Komponente	Menge
Glucose	1 g
Bactopepton	10 g
Neopepton	5 g
Hefeextrakt	1,25 g
NaCl	5 g
Tris	1,25 g
Agar	15 g
H ₂ O	ad 1000 ml

2.4.4 LB-Medium

Zur Kultur von *E. coli* wurde Lauria-Bertani- (LB) Medium eingesetzt (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Herstellung von LB-Agar wurde das Medium mit 15g/l Agar versetzt. Bei Bedarf wurden entsprechende Antibiotika und sonstige Zusätze zugegeben.

Tabelle 2.21: Zusammensetzung des LB-Mediums

Komponente	Menge
Bactopepton	10 g
NaCl	5 g
Hefeextrakt	5 g
H ₂ O	ad 1000 ml

2.4.5 2xTY Medium

Das 2xTY-Medium wurde zur Isolierung kleinerer Mengen Plasmid aus *E. coli* verwendet.

Tabelle 2.22: Zusammensetzung des TY-Mediums

Komponente	Menge
Bactopepton	16 g
NaCl	5 g
Hefeextrakt	5 g
H ₂ O	ad 1000 ml

2.5 Verwendete Antibiotika

Die in der Tabelle 2.23 zusammengefassten Antibiotika wurden den Fest- und Flüssigmedien bei Bedarf zugegeben. Die Stammlösungen wurden nach ihrer Herstellung sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 2.23: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung	Endkonzentration
Tetracyclin	50 % EtOH	3 mg/ml	3 µg/ml
Ampicillin	H ₂ O	20 mg/ml	100 µg/ml
Spectinomycin	H ₂ O	20 mg/ml	80 µg/ml
Streptomycin	H ₂ O	20 mg/ml	200 µg/ml
Erythromycin	90 % EtOH	1 mg/ml	1 µg/ml
Kanamycin	H ₂ O	20 mg/ml	200 µg/ml
Chloramphenicol	H ₂ O	1 mg/ml	1 µg/ml

3. Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Dokumentation des Bakterienwachstums

Nephelometrie

Die Wachstumsmessung erfolgte hauptsächlich mit einem Nephelometer (Digital Unigalvo DS29). Dabei wird die durch die Zelldichte verursachte Lichtstreuung (Nephelo N) der Kultur gemessen. Als Referenz dienten die jeweiligen unbewachsenen Medien und ein Standard, welcher einer Zelldichte von Nephelo=131,2 entsprach. Durch eine halblogarithmische Darstellung konnten durch das Anlegen einer Regressionsgeraden im linearen Bereich der Wachstumskurve sowohl Wachstumsrate μ , als auch die Generationszeit g berechnet werden. Zum Anlegen der Regressionsgeraden wurde das Computerprogramm Origin 5.0 verwendet. Die Wachstumsrate μ wurde hierbei berechnet aus

$$\mu = (\ln N_y - \ln N_x) / (t_y - t_x) \quad [\text{min}^{-1}]$$

mit $\ln N_y$: Zelldichte zum Zeitpunkt t_y in Nephelo-Einheiten [N]

$\ln N_x$: Zelldichte zum Zeitpunkt t_x in Nephelo-Einheiten [N]

t_y, t_x : Zeitpunkte [min]

und die Generationszeit g aus $g = \ln 2 / \mu \quad [\text{min}]$.

3.1.2 Anzuchtbedingungen

Zur Erstellung von Wachstumskurven oder zur Transformation von *Streptococcus pneumoniae* wurde 10 ml CpH8-Medium mit 100-400 μl einer Glycerinkultur des entsprechenden Stammes am Abend des Vortages angeimpft und in ein mit Eis gefülltes Heizwasserbad gestellt. Das Wasserbad war mit einer Zeitschaltuhr versehen, welche in den frühen Morgenstunden das auf 37°C voreingestellte Wasserbad in Betrieb setzte. Diese Prozedur sollte sicherstellen, daß in jedem Experiment Zellen eingesetzt wurden, welche sich in einem vergleichbaren physiologischen Zustand befanden.

3.1.3 Stammkonservierung

Zur Aufbewahrung über längere Zeiträume wurden von den jeweiligen Stämmen Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden in sterile Eppendorf Gefäße 0,8 ml einer logarithmisch wachsenden Kultur mit einer Zelldichte zwischen $N=70$ bis $N=85$, sowie 0,2 ml steriles Glycerin (96%) gegeben, vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.1.4 Mikroskopie

Um eventuelle morphologische Veränderungen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme von *Streptococcus pneumoniae* festzustellen, wurde eine mikroskopische Analyse vorgenommen. Hierzu wurden 10 μl einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur auf ein Objektträger gegeben, mit einem Deckglas überschichtet und zur Minimierung der Flüssigkeit zwischen Objektträger und Deckglas leicht angedrückt. Durch ein 100x-Objektiv (Plan Apo, Nikon Eclipse E600), unter Verwendung von Immersionsöl, wurde die Zellmorphologie begutachtet und mit einer Kamera dokumentiert (CCD-1300B, VDS Vosskühler GmbH).

3.1.5 Transformation von *Streptococcus pneumoniae*

Zur Transformation von *Streptococcus pneumoniae* und seinen Derivaten wurden zuerst kompetente Zellen hergestellt. Dazu wurde eine Kultur des transformierenden Stammes in CpH8-Medium bis Nephelo 30 angezogen und konserviert. Die kompetenten Zellen wurden bei Bedarf aufgetaut und 1/20 verdünnt. Nach Zugabe von 1-5 μl DNA-Lösung wurden die Zellen für eine Stunde bei 30°C und anschließend für zwei Stunden zur phänotypischen Expression bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 300 μl Cph8-Medium zum Ansatz pipettiert, vermischt und jeweils 100 μl auf selektiven D-Blutagarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über 24 bis 48 Stunden bei 37°C .

Die Transformation von Mutanten, welche eine sehr geringe natürliche Kompetenz aufwiesen, wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt, jedoch wurde dem Transformationsansatz zusätzlich der synthetische Kompetenzfaktor CSP (competence stimulating peptide, Håvarstein *et al.*, 1995) zu einer Endkonzentration von 0,05 ng/ μl zugegeben.

3.1.6 Kompetenz-Testung von *Streptococcus pneumoniae*

Im Zuge der phänotypischen Charakterisierung der in dieser Arbeit hergestellten Derivate von *Streptococcus pneumoniae* wurde deren natürliche genetische Kompetenz von der frühen exponentiellen Wachstumsphase bis zum Eintritt in die stationäre Phase analysiert.

Zur Transformation von *Streptococcus pneumoniae* wurden präkompetente Zellen in THB-Medium hergestellt. Hierbei wurde die präkompetente Kultur bei einer Nephelo von 70 mit Glycerin versetzt, in Eppendorf Gefäße portioniert und schockgefroren. Zur Anzucht kompetenter Zellen wurden 10 ml vorgewärmtes C-Medium mit 200 µl präkompetenten Zellen angeimpft und das Wachstum verfolgt. Beim Erreichen einer Zelldichte von ca. $N=10$ wurden nach Zeitabständen von 30 bzw. 20 Minuten Aliquots von 180 µl entnommen und konserviert. Die so erhaltenen Aliquots wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Alle Aliquots wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, und je 20 µl in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gegeben, in welchen 180 µl CpH8-Medium und die zur Transformation eingesetzte DNA bereits vorgelegt waren. Diese Ansätze wurden bei 30°C für 30 min und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Transformationsansätze wurden danach jeweils zu je 100 µl bis zu einer Verdünnung von 10^{-3} auf Platten mit Antibiotikum und bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} auf Platten ohne Antibiotikum ausplattiert.

Nach 24 Stunden wurde die Zahl der Transformanten, sowie die Lebendkeimzahl zu jedem Transformationsansatz bestimmt und der prozentuale Anteil der Transformanten an der Lebendkeimzahl als Funktion der Zelldichten, an denen die zur Transformation eingesetzten Aliquots genommen wurden, aufgetragen. Im so erstellten Graph konnte die genetische Kompetenz in Abhängigkeit von der Zelldichte dargestellt werden.

3.1.7 Transformation von *Escherihia coli*

Herstellung kompetenter Zellen

Von den zu transformierenden *E. coli*-Stämmen wurden Übernachtskulturen in 2 ml LB-Medium angelegt, welche bei 37°C über Nacht schüttelnd inkubiert wurden. Die 2 ml einer bewachsenen Übernachtskultur wurden zu 200 ml frischem, sterilem LB-Medium gegeben (2 L Erlenmeyerkolben mit Schikane) und schüttelnd bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden sogleich für 5min auf Eiswasser gestellt und im Anschluß in sterilen, vorgekühlten JA10-Bechern für 10 min bei 5000 rpm (4400xg) und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 40 ml eiskaltem TFBII-Puffer resuspendiert und für 90 min auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde danach in sterilen, vorgekühlten JA20-Bechern für 10 min bei 6000 rpm (4300xg) und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4ml eiskaltem TFBII-Puffer resuspendiert und 100 µl-Aliquots in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen

in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so aliquotierten kompetenten *E. coli* wurden bis zur Transformation bei -80°C aufbewahrt.

Transformation durch Hitzeschock

Zur Transformation der kompetenten *E. coli*-Stämme wurde ein Aliquot von 100 µl auf Eis aufgetaut, 1 bis 10 µl DNA zugegeben, kurz gemischt und für weitere 20 min auf Eis gehalten. Der Ansatz wurde für 90 s bei 42°C inkubiert und sofort für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 ml Psi-Broth und Überführen in ein kleines Reagenzglas wurde der Ansatz für 1 h zur phänotypischen Expression bei 37°C schüttelnd inkubiert. Je 100 µl bis zur 10⁻²-Verdünnung wurde auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert.

Tabelle 3.1: Zur Transformation von *E. coli* eingesetzte Lösungen

Puffer/Lösung	Komponente	Konzentration
Psi-Broth	LB-Medium	
	MgSO ₄	4 mM
	KCl	10 mM
TFBI	RbCl	100 mM
	MnCl ₂	50 mM
	K-Acetat	30 mM
	CaCl ₂	10 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	pH 5,8 mit Essigsäure	
	Sterilfiltrieren	
TFBII	MOPS	10 mM
	RbCl	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
	pH 8 mit NaOH	
	Autoklavieren	

3.2 Arbeiten mit Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

3.2.1 Isolierung von chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae*

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae* wurde ein Protokoll verwendet, welches auf der von Marmur 1961 beschriebenen Methode basiert. Diese Methode ist schnell durchführbar und liefert große Mengen an DNA.

Für die Präparation wurden 10 ml Cph8-Medium mit 200 ml Glycerinkultur angeimpft. Bei 37°C wurden die Zellen bis ca. Nephelo 60-80 wachsen gelassen. Danach wurde die Kultur in 15 ml Greiner-Zentrifugenröhrchen überführt und in einer vorgekühlten Zentrifuge (Biofuge Stratos,

Haraeus Instruments) bei 7000 rpm und 4°C für 10 Min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml kalter 0,9% Saline resuspendiert. Diese Suspension wurde in zwei 1,5 ml Eppendorf-Gefäße verteilt und bei 14000 rpm für 1 min in einer Eppendorf Zentrifuge zentrifugiert. Nach vollständigem Absaugen des Überstandes konnten die Pellets bei –20°C eingefroren werden. Die eigentliche DNA-Isolierung wurde mit je einem der Pellets durchgeführt, das andere wurde als Reserve im Gefrierschrank bei –20°C aufbewahrt.

Als erstes wurde das Pellet auf Eis aufgetaut und in 180 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) wurde das Reaktionsgefäß in ein 37°C Wasserbad gestellt. Nach kurzem Aufwärmen wurden 200 µl 2% SDS-Lösung zugegeben, durch Invertieren gut gemischt und die einsetzende Lyse beobachtet. Nach vollständiger Lyse wurden 100 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) dazugegeben, gemischt und bei 37°C für weitere 10 min inkubiert.

Nach der Inkubation konnte die Phenolextraktion durchgeführt werden. Dazu wurden 500 µl einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) zugegeben und auf dem Eppendorfschüttler 30 Minuten gerüttelt. Im Anschluß wurde die Lösung 3 Minuten bei 14000 rpm abzentrifugiert. Die Oberphase wurde vorsichtig abgehoben und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion wurde wiederholt und 10 min gerüttelt. Nach wiederholter Zentrifugation wurde die Oberphase zum Fällern der DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol versetzt, gemischt und für ca. 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Lösung 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt.

Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 100% Ethanol gewaschen und das Pellet im Exsikkator getrocknet. Die DNA wurde letztendlich in 50 bis 200 µl TE-Puffer aufgenommen, gevortext und bei 37°C gelöst. Die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung wurden im Anschluß auf einem 1% Agarosegel durchgeführt. Die so isolierte chromosomale DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 3.2: Zur Isolierung chromosomaler DNA aus *Streptococcus pneumoniae* eingesetzte Lösungen

Lösung	Komponente	Konzentration
RNase-Lösung	RNase	10 mg/ml
	NaCl	0,15 M
	Na ₃ -Citrat	0,015 M
	15 min bei 100°C	
	Bei RT Abkühlen	
Proteinase K	Proteinase K (Roth)	20 mg/ml in Wasser
2 % SDS	SDS	2 % (w/v) in Wasser
TE-Puffer	Tris-HCl pH8	10 mM
	EDTA	1 mM
6x DNA Probenpuffer	Ficoll 400	15% (W/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylencianol	0,25 % (W/v)

3.2.2 Plasmid Mini-Präparation aus *Escherichia coli*

Die Plasmidisolierung erfolgte mittels alkalischer Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Das Prinzip beruht auf der Lyse der Zellen durch Detergenz bei gleichzeitiger Denaturierung der chromosomalen DNA bei hohem pH-Wert. Nach Neutralisierung fällt die hochmolekulare chromosomale DNA als ein Komplex aus und kann durch Zentrifugation von der Plasmid DNA abgetrennt werden. Die chromosomale DNA sollte hierbei in Lösung bleiben.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden 2 ml 2xTY-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt. Die Lösung wurde mit einer *E. coli*-Kolonie beimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Am Morgen wurde das bewachsene Medium in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 100 µl Lösung 1 durch Vortexen vollständig resuspendiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden 200 µl Lösung 2 zugegeben, durch Invertieren gemischt und für weitere 5 min auf Eis gestellt. Danach wurde 200 µl eiskalte Lösung 3 zum Zellysat zugegeben, invertiert und nochmals 5 min auf Eis gehalten.

Im Anschluß wurde der Ansatz 15 min bei 14.000U rpm zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol gefällt. Zur Fällung wurde das Gefäß für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und das Pellet in 200 µl Lösung 4, welche mit RNase versetzt wurde, gelöst. Um den vollständigen Abbau von RNA zu erreichen, wurde der Ansatz für ca. 10 min bei RT stehen gelassen oder für 5 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 0,5 ml 100% Ethanol zugegeben, gut gemischt und für 5 min auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation von 5 min bei 14.000 rpm. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit 200 µl 100% Ethanol gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl TE-Puffer gelöst.

Tabelle 3.3: Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Komponente		Menge
Lösung1	Saccharose	30%
	Tris	25 mM
	EDTA	10 mM
	pH 8,0 mit NaCl einstellen, bei 4°C lagern	
	Lysozym	20 mg/ml Lösung 1
Lösung2	NaOH	0,1 N
	SDS	1%
Lösung3	K-Acetat	1,5 M
	pH 4,8 mit Eisessig einstellen	
Lösung4	Tris	50 mM
	Na-Acetat	100 mM
	PH 7,5 mit Essigsäure einstellen	
Lösung 4 mit RNase:	Lösung 4	5 ml
	RNase (Tabelle 2.12)	25 µl

3.2.3 Plasmid Maxi-Präparation aus *E. coli* (Nucleobond AX-Kit, Macherey-Nagel)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* in großem Maßstab, wurde das Nucleobond[®] AX 100-Kit (Macherey-Nagel, Düren) eingesetzt. Hierbei erfolgte die Aufreinigung der nach der Methode von Birnboim & Doly (1979) freigesetzten Plasmid-DNA über eine Anionenaustauscher-Säule auf der Basis von Kieselgel.

Zwei 500 ml Erlenmeyer-Kolben wurden mit je 100 ml LB-Medium befüllt, autoklaviert und mit entsprechendem Antibiotikum versetzt. Je 5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden zupipettiert und die Kolben bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Isolation und Aufreinigung erfolgte entsprechend vorgegebener Anleitung (Macherey-Nagel). Zur Qualitätskontrolle des isolierten Plasmids und zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Teil für eine Agarosegelelektrophorese eingesetzt.

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion lassen sich *in vitro* DNA-Fragmente amplifizieren. Hierzu werden neben der ds-Template-DNA zwei Oligonukleotidprimer, welche zum Plusstrang bzw. zum Minusstrang der Template-DNA komplementär sind und die Zielsequenz eingrenzen, benötigt. Eine hitzestabile DNA-Polymerase (Newton und Graham, 1994) amplifiziert bei der Reaktion die Zielsequenz der Template-DNA. Ein PCR-Lauf besteht im Grunde aus drei Reaktionsschritten:

Denaturierung der Template-DNA: Auftrennung der dsDNA in ssDNA (94-98°C)

Primer-Annealing: Anlagerung der Primer an die denaturierte Template-DNA (Primer-abhängige Temperatur)

Elongation: Verlängerung der Primer zur Synthese der Komplementärstränge (72°C)

Die Einhaltung der bei den einzelnen Reaktionsschritten benötigten Temperaturen wird durch die Durchführung in einem programmierbaren Thermocycler (T1 Thermocycler, Biometra) erreicht.

Primer-Auswahl

Die Auswahl der in dieser Arbeit eingesetzten Primer-Paare erfolgte nach den von Newton und Graham (1994) aufgestellten Richtlinien. Diese betreffen G/C-Gehalt, Länge und Basenverteilung. Die Schmelztemperatur beider Primer sollte hierbei annähernd gleich sein. Die PCR wurde je nach Anforderungen an das PCR-Produkt mit verschiedenen DNA-Polymerasen durchgeführt.

Standardansatz: Taq-Polymerase

Handelte es sich um eine analytische PCR, sollten die amplifizierten DNA-Fragmente also nicht zur Klonierung eingesetzt werden und war nur die Größe des amplifizierten DNA-Fragments von Interesse, so waren statistisch auftretende falsch eingebaute Nukleotide nicht von Bedeutung. Daher wurde hierfür ein Standardansatz mit Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Red Goldstar™, Eurogentec) verwendet. Diese Polymerase besitzt keine Korrekturlesefunktion (proof reading, 3'-5'-Exonukleaseaktivität) und die Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden liegt bei ca. 8×10^{-6} . Ansatz und Programm für eine Reaktion wurden wie folgt verwendet:

Tabelle 3.4: Standardansatz für eine PCR mit Taq-Polymerase

Komponente	Menge
dNTP's (10 mM)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	8 µl
10x Puffer	10 µl
Forward-Primer (10 pM/µl)	1 µl
Reverse-Primer (10 pM/µl)	1 µl
Taq-Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O millipore	x µl
Template-DNA	1 µl
Gesamtvolumen	100 µl

Tabelle 3.5: Standardprogramm für eine PCR mit Taq-Polymerase

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1. Denaturierung	96	4
2. Denaturierung	96	1
3. Primer-Annealing	Primer T _m -5°C	1
4. Elongation	72	1 / kb PCR-Produkt ¹
5. finale Elongation	72	4

¹) Die Schritte 2-4 wurden 30x wiederholt.

Kolonie PCR

Die Kolonie PCR wurde bei *E. coli* zur Kontrolle bei Klonierungen angewendet. Hierbei wurde ein Standardansatz mit der Taq-Polymerase angesetzt und ein Teil der Kolonie des zu untersuchenden Klons mithilfe eines Zahnstochers hineingegeben.

Eine Kolonie PCR mit modifizierten Protokoll wurde mit *S. pneumoniae* durchgeführt. Hierzu wurden 200 µl Zellen abzentrifugiert, der Überstand entfernt und mit 50 µl H₂O versetzt. 1 µl aus dieser Lösung wurde als Template in einem Standard PCR-Ansatz mit Taq-Polymerase eingesetzt.

Ansatz mit iProof High-Fidelity DNA Polymerase

Sollten die amplifizierten Fragmente kloniert oder bei überlappenden PCRs eingesetzt werden, wurde die iProof High-Fidelity DNA Polymerase für die Amplifikation verwendet. Diese Polymerase besitzt

eine Korrekturlesefunktion (proof reading), eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Mit dieser Polymerase ist laut Herstellerangaben mit einer bis zu 50x niedrigeren Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden im Vergleich zur Taq-Polymerase zu rechnen. Zusätzlich lassen sich mit dieser Polymerase sehr lange PCR-Produkte in kürzerer Zeit amplifizieren und sie produziert im Gegensatz zu Taq-Polymerase DNA-Fragmente mit glatten Enden. Ansatz und Programm (50 µl Gesamtansatz) wurden wie folgt verwendet:

Tabelle 3.6: Standardansatz für eine PCR mit iProof-Polymerase

Komponente	Menge
dNTP's (10 mM)	1 µl
5x Puffer HF(Bio-Rad)	10 µl
Forward-Primer (10 pM/µl)	1 µl
Reverse-Primer (10 pM/µl)	1 µl
iProof-Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O millipore	y µl
Template-DNA	x µl
Gesamtvolumen	50 µl

Tabelle 3.7: Standardprogramm für einen Ansatz mit iProof-Polymerase

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1. Denaturierung	98	30
2. Denaturierung	98	10
3. Primer-Annealing	Primer-T _m +3°C	20
4. Elongation	72	30 / kb PCR-Produkt ¹
5. finale Elongation	72	300

¹) Die Schritte 2-4 wurden 30x wiederholt.

Ansatz zur überlappenden PCR

Einige Konstrukte zur Deletion oder zum Austausch von DNA-Regionen in *Streptococcus pneumoniae* wurden in der vorliegenden Arbeit unter Einsatz einer überlappenden PCR hergestellt. In dieser Variation einer herkömmlichen PCR werden zwei oder mehrere zuvor hergestellte PCR-Produkte in einer PCR zusammengefügt. Hierzu mußten die Ausgangsfragmente an dem Ende, mit welchem sie an eines der Enden eines weiteren Fragments verknüpft werden sollten, einen ca. 40 bp-langen komplementären Bereich zum Ende des anderen Fragments besitzen und umgekehrt. Dies wurde erreicht, indem die Ausgangsfragmente in einer PCR synthetisiert wurden, wobei die eingesetzten Primer an einem Ende eine ca. 20 bp-lange, zum Ende des anderen Fragments komplementäre Sequenz am entsprechenden Ende des jeweiligen Amplifikats anfügten. Die so hergestellten Fragmente wurden nun zunächst in zwei PCR-Zyklen ohne zusätzliche Primer verlängert. Hierbei wurde eine niedrige Annealing-Temperatur (42°C) gewählt und eine Elongationszeit von 2 Minuten. Die komplementären Bereiche an den Enden der Fragmente dienten bei dieser Reaktion selbst als Primer. Die beiden Zyklen wurden Auffüllreaktion genannt. Im

Anschluß an die Auffüllreaktion wurde die PCR durch Abkühlen auf 10°C für 3 min unterbrochen und ein Primerpaar zugegeben, welches zur Amplifikation des Volle-Länge-Produktes führt. Die PCR-Produkte wurden im Anschluß aufgereinigt und weiter verwendet.

3.2.5 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Die PCR-Produkte von präparativen PCR-Ansätzen wurden vor der weiteren Verwendung aufgereinigt. 5 bis 10 µl der Ansätze wurden zur Kontrolle auf einem Agarosegel analysiert. Zur Aufreinigung wurde in den meisten Fällen das JETquick PCR Purification Kit 250 der Firma Genomed verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach vorgegebener Anleitung. Bei überlappenden PCR-Produkten wurde eine Aufreinigung mittels Gelexcision (siehe Abschnitt 3.2.8) durchgeführt.

3.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde entweder die Absorption der Lösungen bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm in einem Photometer gemessen (chromosomale DNA) oder bei einer Agarosegelelektrophorese die Bandenintensität mit den Bandenintensitäten von DNA-Lösungen bekannter Konzentration verglichen (bei Plasmid-DNA und PCR-Produkten).

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies) wurde die Absorption der enthaltenen DNA bei 260 nm, die Konzentration eventuell noch vorhandenen Proteins oder Phenols bei 280 nm bestimmt. Hierzu wurde je 1 µl der zu untersuchenden DNA-Lösung eingesetzt. Die Absorption wurde aus verdünnten DNA-Lösungen bestimmt. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} ist hierbei ein Maß für die Reinheit der DNA-Proben und sollte für DNA zwischen 1,8 - 2,0 liegen (Ausubel *et al.*, 1990). Die Konzentrationsbestimmung basierte auf folgenden Werten:

dsDNA	1 OD_{260} = 50 ng/µl
ssDNA	1 OD_{260} = 33 ng/µl

Bei der Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegelelektrophorese dienten 3 Lösungen von pBR322 unterschiedlicher Konzentration als Konzentrationsstandard:

- 1: 5 ng/µl
- 2: 10 ng/µl
- 3: 20 ng/µl

Von den 3 Standards wurden je 5 µl auf das Agarosegel aufgetragen und die Intensitäten mit denen der Proben verglichen. Nach der Auftrennung und dem Anfärben mit Ethidiumbromid wurden die

Bandenintensitäten der Standards und der Proben im UV-Licht eines Transilluminators verglichen und photodokumentiert.

3.2.7 DNA-Elektrophorese

DNA-Fragmente und Plasmide wurden in Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarose-Konzentration betrug entweder 0,8%, 1% oder 1,5% (je nach Größe der aufzutrennenden DNA, Sambrook *et al.*, 1989). Die Größenbestimmung erfolgte bei linearen DNA-Fragmenten durch einen Vergleich mit geeigneten Molekulargewichtsstandards. Die Wanderungsstrecke ist hierbei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekülgröße. Als Molekulargewichtsstandard diente eine 1kb Leiter und eine 100 bp Leiter „gene ruler“ der Firma Fermentas.

Das Agarose-Pulver (SEAKEM LE-Agarose, FMC Bioproducts, Rockland) wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle im TAE-Laufpuffer geschmolzen. Die Elektrophoresekammer wurde an beiden Seiten mit Klebeband abgedichtet. Die im Laufpuffer gelöste Agarose wurde auf ca. 60°C abgekühlt und in die Kammer gegossen. Die Taschen wurden durch das Einsetzen des Plexiglaskammes in die flüssige Agarose gebildet. Nach ca. 20 min war die Agarose erstarrt und die Elektrophoresekammer wurde in die mit Laufpuffer befüllte Elektrophorese-Apparatur gegeben. Vorher wurden noch die Klebebänder und der Kamm entfernt. Das Gel sollte nun ca. 0,5 cm mit Laufpuffer überschichtet sein. Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{6}$ Volumen 6 x DNA-Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 8 V/cm. Nach dem Gel-Lauf wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Färbebad (5 µg/ml) für 20-30 min gefärbt. Hierbei interkaliert der Farbstoff zwischen den Basen der DNA. Die Banden der aufgetrennten DNA konnten somit durch UV-Licht mit der Wellenlänge 254 nm auf einem Transilluminator sichtbar gemacht werden. Dokumentiert wurden die Gele mit einer Video Copy Processor Kamera (P68E, Mitsubishi).

Tabelle 3.8: Zusammensetzung des TAE-Laufpuffers

TAE-Puffer (50 x)	EDTA	0,1 M
	Essigsäure	1 M
	Tris-HCl pH8,2	2 M

3.2.8 DNA-Elution aus Agarosegelen

Überlappende PCR-Produkte bzw. enzymatisch verdaute Plasmide wurden aus Agarosegelen isoliert. Bei dieser Methode werden die DNA Fragmente zuerst nach ihren Größen aufgetrennt und die gewünschte Fragmente werden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Zur Isolierung einzelner DNA-Fragmente wurden Gele mit größeren, dem aufzutragenden Volumen entsprechenden

Geltaschen gegossen. Die zu isolierende Bande wurde mit einem Skalpell unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und im Anschluß unter Verwendung des PCR clean-up Gel extraction Kits (Macherey-Nagel) aus der Agarose eluiert.

3.2.9 Sequenzierung von DNA

Zur Bestimmung der Nukleotid-Sequenz von DNA-Fragmenten wurde ein Cycle-Sequencing-Verfahren mit dem BigDye-Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgt hierbei durch eine enzymatische Sequenzierung nach Sanger, Nicklen und Coulson (1977).

Es handelt sich hierbei um eine modifizierte Polymerase-Reaktion unter zusätzlicher Verwendung von Didesoxynukleotiden (ddNTPs), welche eine weitere Primer-Extension durch die Taq-Polymerase verhindern. Beim Einbau der ddNTPs durch die Polymerase kommt es somit zum Kettenabbruch, da ddNTPs am 3'-Ende eines DNA-Moleküls kein Substrat mehr für die Polymerase darstellen. Die Menge der ddNTPs ist im Verhältnis zu den entsprechenden dNTPs gering gehalten, um einen eher seltenen Einbau in das neue DNA-Molekül zu gewährleisten. Somit wird eine Serie von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten gebildet, welche alle mit dem entsprechenden ddNTP enden. Dieses Gemisch aus unterschiedlich langen DNA-Ketten kann nun mittels einer Elektrophorese aufgetrennt werden. Da die vier im Ansatz enthaltenen ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, können die DNA-Fragmente in nur einem Lauf durch einen Argon-Ionen-Laser, welcher die ddNTPs zur Fluoreszenz anregt, detektiert werden.

Zur Durchführung der Sequenzreaktion wurde folgender Ansatz hergestellt:

Tabelle 3.9: Standardansatz zur Sequenzreaktion

Komponente	Menge
BigDye Terminator Ready Mix 1.1	2 µl
Template-DNA	10-15 ng/100bp
Primer (10 pM)	1 µl
H ₂ O millipore	ad 10 µl

Der Ansatz wurde in einem Thermocycler mit folgendem Temperaturprogramm inkubiert:

Tabelle 3.10: Programm zur Sequenzreaktion

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1. Denaturierung	96	300
2. Denaturierung	96	30
3. Primer – Annealing	50	10
4. Elongation	60	240 ¹⁾

¹⁾ Die Schritte 2-4 wurden 25x wiederholt.

Sequenzlauf

Der eigentliche Sequenzlauf wurde mit einem ABI Prism 3100 Genetic Analyzer von Applied Biosystems im Nano+Biocenter der Universität Kaiserslautern durchgeführt.

Sequenz-Analyse

Die Überprüfung und das Assembly der erhaltenen Sequenzen wurde mit Hilfe folgender Software durchgeführt:

- Blast 2 Sequences: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html
- Chromas v1.45

3.3 Arbeiten mit Ribonukleinsäuren (RNA)

Bei den Arbeiten mit RNA wurden besondere Vorsichtsmaßnahmen eingeführt. Um die Kontamination durch RNasen zu vermeiden, wurde stets mit Handschuhen gearbeitet. Alle Glaswaren und Gerätschaften, deren Oberflächen mit RNA in Kontakt kommen, wurden mit RNaseZAP (Ambion) zur Inaktivierung der RNasen vorbehandelt. Zum Lösen oder Verdünnen der RNA wurde stets DEPC-Behandeltes Wasser (Ambion) verwendet. Die eingesetzten Puffer und Lösungen wurden stets frisch mit Millipore-Wasser angesetzt. Glaspipetten wurden für 12 h bei 200°C gebacken und für automatische Pipetten wurden Spitzen mit Filter (Filtertips, Gbo) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden nach Möglichkeit zügig auf Eis durchgeführt. Die Lagerung isolierter, aufgereinigter RNA erfolgte aliquotiert bei -80°C.

3.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *Streptococcus pneumoniae*

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde die Präparation nach der Hot-Phenol Methode durchgeführt. Hierdurch konnten RNA-Mengen von bis zu 500 µg aus 100 ml bewachsener Kultur mit einer Zelldichte von Nephelo 70 gewonnen werden.

Zellkultur und Ernte

100 ml CpH8-Medium wurden in 500 ml Erlenmeyer-Kolben auf 37°C vorgewärmt und mit 2 ml aus einer exponentiell wachsender Übernachtskultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einem Heizwasserbad. Zur Dokumentation des Wachstums wurden zu Beginn alle 60 min, ab der exponentielle Phase alle 20-30 min 6 ml Kultur entnommen und in Reagenzgläsern in einem Nephelometer die Zelldichte gemessen. Bei Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden 100 ml Kultur in zwei 50 ml Greiner-Röhrchen geteilt und bei 8000 rpm (8800xg) und 37°C für 2 min

pelletiert. Die erhaltenen Pellets wurden umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Isolierung der Gesamt-RNA

Das Bakterienpellet wurde in 4 ml NAE-gesättigtem Phenol (60°C) zügig resuspendiert und für 5 min bei 60°C im Heizwasserbad inkubiert. Zur Suspension wurden 4 ml NAES-Puffer (60°C) gegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Es folgte eine weitere Inkubation für 5 min bei 60°C, wobei zwischendurch nochmals invertiert wurde. Zum Abkühlen wurde der Ansatz für 5 min auf Eis gestellt und danach 8 min bei 8000 rpm (8800xg) und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde in ein 15 ml PhaseLockGel-Röhrchen (Eppendorf) überführt, mit 4 ml Phenol:Chloroform 6:1 versetzt und für 2 min invertiert. Die Trennung der beiden Phasen erfolgte durch Zentrifugation (8 min, 8000 rpm, 4°C). Die wässrige Phase wurde erneut abgenommen und die zuvor beschriebene Phenolisierung wiederholt. Nach der Zentrifugation wurde die Oberphase in ein steriles 15 ml Greiner-Röhrchen überführt, in welchem bereits 4 ml Isopropanol und 400 µl 3 M Na-Acetat pH 5,1 vorgelegt waren. Durch mehrmaliges Invertieren wurde gemischt und über Nacht bei -20°C gefällt. Nach der Fällung erfolgte eine Zentrifugation bei 8000 rpm (8800xg) für 40 min und 4°C. Das Pellet wurde mit 4 ml 70 % EtOH gewaschen, in einem Exsikkator für 30 min getrocknet und je nach Verwendung in 200-500 µl DEPC-Wasser gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die so isolierte RNA bei -80°C aufbewahrt.

Tabelle 3.11: Zur Isolierung von Gesamt-RNA eingesetzte Lösungen

Lösung	Komponente	Konzentration
NAE-Puffer	Na-Acetat pH 5,1	50 mM
	EDTA	10 mM
NAES-Puffer	NAE-Puffer	
	SDS	1 % (w/v)
NAE-Phenol	Aqua-Phenol (Roth)	
	NAE-Puffer	50 ml/500 ml
Phenol:Chloroform 6:1	Aqua-Phenol (Roth)	5 Volumenanteile
	Chloroform (Roth)	1 Volumenanteil
3 M Na-Acetat	Na-Acetat pH 5,1, eingestellt mit Essigsäure	3 M

DNaseI-Verdau

Die in der Gesamt-Nukleinsäure-Lösung vorhandene chromosomale DNA musste durch einen DNaseI-Verdau degradiert werden. Hierzu wurde RNase-freie DNaseI (NEB) verwendet und ein Ansatz wie folgt pipettiert:

360 µl RNA-Lösung
40 µl 10 x DNaseI-Puffer (NEB)
10 µl DNaseI (2 U/µl, NEB)

Die Inkubation wurde für 15 min bei 37°C durchgeführt.

3.3.2 Aufreinigung von Gesamt-RNA

Aufreinigung durch Kieselgel-Säulen

Die DNaseI-verdaute Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des RNeasy Midi-Kits (Qiagen) bzw. bei kleineren Volumen mit dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellerprotokolls gereinigt und in einem entsprechenden Volumen DEPC-Wasser (Ambion) eluiert. Diese Aufreinigungsmethode wurde bei den RNA-Präps, die zur Microarray-Analyse und Realtime-Analyse verwendet wurden, durchgeführt.

Aufreinigung durch Phenolisierung und Ethanolpräzipitation von RNA

Um den Verlust der kleinen RNAs, deren Länge unter 100 Basen beträgt zu minimieren, wurde auf die Aufreinigung mit den Kits verzichtet und es wurde eine Phenolisierung durchgeführt. Diese Methode wurde bei den RNA-Präparationen, die für Northern-Analyse, 5'- und 3'-RACE verwendet wurden, angewendet. Hierzu wurde die 400 µl RNA-Lösung mit 400 µl Aqua-Phenol (Roth) versetzt. Im Anschluß wurde 30 s gevortext und für 5 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Oberphase wurde mit 44 µl 3 M Na-Acetat pH 5,1 und 900 µl eiskaltem 100 % EtOH vermischt, 20 min bei -20°C inkubiert und für 20 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl kaltem 70 % EtOH gewaschen und erneut 5 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in einem entsprechenden Volumen DEPC-Wasser gelöst.

3.3.3 Überprüfung der Qualität von RNA

Um Ergebnisse späterer Analysen nicht zu verfälschen, war es unbedingt notwendig, die isolierte und aufgereinigte RNA auf Rückstände von DNA oder auf Anzeichen einer Degradation zu untersuchen. Hierzu wurden einerseits Kontroll-PCRs zum Ausschluß von DNA und andererseits eine Gel-Analyse in einem 1,5% Agarosegel zum Aufdecken eventueller Degradation durchgeführt.

3.3.4 Quantifizierung und Bestimmung der Reinheit von RNA

Die RNA-Konzentration wurde photometrisch anhand von 1 µl RNA-Lösung geeigneter Verdünnung im NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies) bestimmt. Hierbei entsprach 1 OD₂₆₀ = 40 ng/µl einzelsträngiger RNA. Die Reinheit von RNA wurde durch die Verhältnisse der Absorptionen bei 230 (Messung von Verunreinigungen wie z.B. Polysacchariden), 260 und 280nm (Messung von Verunreinigungen durch Proteine und Alkohol) bestimmt. Ein Verhältnis E₂₆₀ / E₂₈₀ von 2 und ein Verhältnis E₂₆₀ / E₂₃₀ von >2 zeigten einen genügend hohen Reinheitsgrad der isolierten RNA an.

3.3.5 *In vitro* Transkription von RNA

Mittels *in vitro* Transkription mit der T7 RNA-Polymerase lässt sich RNA in großen Mengen produzieren. Als Template für die RNA-Polymerase wurden PCR Produkte eingesetzt. Den PCR Produkten wurde an die 5'-Enden die T7-Promotorsequenz angehängt.

T7 Promotorsequenz: 5' TAATACGACTCACTATAGG

Der Reaktionsansatz wurde wie in der Tabelle 3.12 zusammenpipettiert und die Reaktion erfolgte über Nacht bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurde ein DNaseI-Verdau durchgeführt. Den Ansätzen wurde 15 µl DNase (NEB) zugegeben und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Nach dem DNaseI Verdau wurde die RNA über RNeasy Mini-Kit (Qiagen) aufgereinigt und mit DEPC-Wasser eluiert.

Tabelle 3.12: Standardansatz für eine *in vitro* Transkription mit der T7 RNA-Polymerase

Komponente	Menge
NTP's (je 25 mM)	10 µl
10x Puffer (Roche)	20 µl
Template	10 µl
T7 RNA Polymerase (Roche, 20 U/µl)	5 µl
RNase-Inhibitor (Ambion, 40 U/µl)	4 µl
DEPC-Wasser (Ambion)	151 µl
Gesamtvolumen	200 µl

Zur Kontrolle wurde die RNA auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte in TBE-Puffer bei 20 V/cm, je nach Größe der RNA, für 1,5 bis 2,5 Stunden.

Tabelle 3.13: Zusammensetzung denaturierendes PAA-Gel (8%) mit 6,4 M Harnstoff

Komponente	Volumen
PAA 37,5 :1	6 ml
8 M Harnstoff in TBE-Puffer 1x	24 ml
APS 10%	150 µl
TEMED	75 µl

3.3.6 RNA-RNA Interaktionsstudien: Electrophoretic Mobility shift Assay (EMSA)

Um die direkte Interaktion der csRNAs mit den Zielgenen zu untersuchen, wurden RNA-RNA Interaktionsstudien durchgeführt. Dazu wurden die csRNAs und die ersten 170 Basen der mRNA des Zielgen *comC* und *spr0081* mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase *in vitro* produziert. Als Negativkontrolle wurden die ersten 170 Basen der mRNA des *htrA* Gens verwendet. Die Transkriptions-Ansätze wurden DNase-verdaut und die RNA anschließend mit dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen) aufgereinigt. Es wurde je ein Ansatz mit Konzentrationen von 5 µg/ml und 10 µg/ml eingestellt. Diese Konzentration entsprach 80 bzw. 160 nM/µl. Bei jedem Experiment wurden jeweils neun Proben angefertigt. Vier Ansätze mit dem Zielgen *comC* oder *spr0081*, vier Ansätze mit der Negativkontrolle *htrA* und ein Ansatz mit der entsprechenden csRNA alleine. Jeweils 160 nM (2 µl aus der Stocklösung 5 µg/ml) Zielgen-RNA oder Kontroll-RNA wurden verwendet. Diese wurden vorgelegt und mit einer steigenden Menge von csRNA vermischt. Im Falle der Zielgene wurden folgende Konzentrationen an csRNA zugegeben. Ansatz I enthielt keine csRNA, Ansatz II 80 nM (0,58 µl aus der Stocklösung mit 5 µg/ml), Ansatz III 160 nM (1,16 µl aus der Stocklösung mit 5 µg/ml) und Ansatz IV 800 nM (5,9 µl aus der Stocklösung mit 5 µg/ml). Im Falle der Negativkontrolle (*htrA*) wurde der erste Ansatz ebenfalls ohne csRNA inkubiert, im zweiten Ansatz mit 180 nM (1,16 µl aus der Stocklösung mit 5 µg/ml) csRNA, im dritten Ansatz mit 800 nM (5,9 µl aus der Stocklösung mit 5 µg/ml) und im vierten 1600 nM (5,9 µl aus der Stocklösung mit 10 µg/ml) csRNA. Diese Zusammensetzung ist in der Tabelle 3.14 dargestellt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte in TMN-Puffer, wobei das Gesamtvolumen 10 µl betrug.

Tabelle 3.14: Zusammensetzung der Ansätze für die RNA/RNA Interaktion

Komponente	comC-RNA				csRNA	htrA-RNA			
Zielgen (nM)	160	160	160	160	0	160	160	160	160
csRNA (nM)	0	80	160	800	800	0	160	800	1600
TMN 10x (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H ₂ O (µl)	7	6,4	5,8	1,1	3,1	7	5,8	1,1	1,1

Tabelle 3.15: Zusammensetzung TMN-Puffer

Komponente	Endkonzentration
Tris	20mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	2 mM

Nachdem die Komponenten zusammengegeben wurden, wurden die Ansätze 2 min bei 95 °C denaturiert. Nach einer kurzen Abkühlung auf Eis wurden die Ansätze 20 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze mit 1 µl 10x Gel loading solution (Ambion, 40% Saccharose, 0,17% Xylene Cyanol, 0,17% Bromphenol Blau) versetzt und auf ein acht prozentiges natives PAA-Gel aufgetragen. Für die Gele wurde das Mini-PROTEAN® 3 Cell-System von BioRad verwendet. Die Auftrennung wurde bei 10 bis 12 mA und 4°C ca. 2 Stunden durchgeführt.

Die Färbung der Gele erfolgte mit SYBR Green II (Molecular Probes). Die Farbstofflösung lag 10000x konzentriert vor. Für die Färbung wurden 10 µl Farbstoff in 100 ml TBE verdünnt verwendet. Die Gele wurden 20 Minuten in der Lösung im Dunkeln inkubiert. Die Detektion der RNA wurde durch Scannen in einem Fluorimager 595 (Molecular Dynamics) durchgeführt.

Tabelle 3.16: Zusammensetzung natives PAA-Gel (8%)

Komponente	Endkonzentration
PAA 37,5 :1	4,05 ml
TBE-Puffer 1x	10,85
APS 10%	75 µl
TEMED	7,5 µl

3.3.7 Reverse Transkription (RT-PCR)

Unter reverser Transkription versteht man das Umschreiben der RNA in cDNA. Dabei kann sowohl die Gesamt-RNA oder nur spezielle mRNA in cDNA umgewandelt werden. Dies hängt von der Art der verwendeten Primer ab. Die Methode wurde in dieser Arbeit bei mehreren Untersuchungen angewendet. Als erstes bei der Bestimmung von 5'-Enden bzw. 3'-Enden von Genen mittels RACE-Analyse. Auch bei der Bestimmung der Expression bestimmter Gene mittels realtime RT-PCR wurde ein vorheriges Umschreiben der RNA in cDNA benötigt. Zudem wurde die reverse Transkription der Gesamt-RNA auch bei der Microarray basierten Transkriptomanalyse eingesetzt.

Die zur RT-PCR eingesetzte RNA wurde mit der hot phenol Methode isoliert und die Aufreinigung der RNAs, die zur realtime PCR eingesetzt werden sollten, erfolgte mit dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen). Die RNAs, die zu 3'-und 5'-RACE-Analyse Experimenten verwendet wurden, wurden phenolisiert und gefällt.

Zur reversen Transkription wurde das First Strand cDNA-Synthesis Kit for RT-PCR (Roche) eingesetzt. Hierbei kam eine Avian Myeloblastis Virus (AMV) Reverse Transkriptase zum Einsatz. Reaktionsansatz und -Bedingungen gestalteten sich nach Herstellerangaben wie folgt:

Tabelle 3.17: Ansatz für eine RT-Reaktion mit AMV Reverse Transkriptase

Komponente	Menge
dNTP's (je 10 mM)	2 µl
10 x AMV-Puffer (Roche)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
Primer (spezifisch 1 pmol/µl oder random-Hexamer 10 pmol/µl)	2 µl
RNase-Inhibitor (50 U/µl)	1 µl
AMV Reverse Transkriptase	0,8 µl
Template-RNA	y µl
DEPC-Wasser (Ambion)	z µl
Gesamtvolumen	20 µl

Zum Aufbrechen möglicher Sekundärstrukturen der RNA wurde die RNA vor Zugabe zum Reaktionsansatz für 15 min bei 65°C inkubiert und sofort für 5 min in Eiswasser gekühlt.

Tabelle 3.18: Programm für eine RT-PCR mit AMV Reverse Transkriptase

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1. Primer-Annealing	25	10
2. reverse Transkription	42	60
3. AMV-Inaktivierung	99	5
4. Kühlung	4	2

Die so hergestellte cDNA konnte direkt in nachfolgenden Reaktionen weiter verwendet werden.

3.3.8 Realtime RT-PCR

Zur Quantifizierung einzelner Transkripte in verschiedenen Stämmen wurde eine realtime RT-PCR unter Verwendung eines LightCycler-Thermocyclers (Version 2.0, Roche) durchgeführt. Prinzipiell werden bei einer realtime PCR zuerst zwei aus den zu vergleichenden Stämmen stammende Gesamt-RNA-Isolate in einer vorangestellten RT-Reaktion mit Random-Primern in cDNA umgeschrieben. Hierbei ist es unbedingt notwendig, daß im Vorfeld chromosomale DNA vollständig durch einen DNaseI-Verdau degradiert wurde, da noch vorhandene DNA das Ergebnis der späteren realtime PCR verfälschen würde. In der vorliegenden Arbeit wurde dies durch Kontroll-PCRs auf der DNaseI-verdauten RNA gewährleistet. In der eigentlichen realtime PCR wird mit genspezifischen Primern die cDNA des zu quantifizierenden Transkripts amplifiziert. Die Menge der amplifizierten DNA wird am

Ende von jedem PCR-Zyklus durch Messung der Fluoreszenz des durch Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green mit der dsDNA entstehenden Komplexes bestimmt. Am Ende einer realtime PCR wird für das untersuchte Transkript ein C_p -Wert berechnet, welcher als der Wert (oder die Zyklen-Anzahl) definiert ist, bei welchem das Fluoreszenzsignal eine definierte Detektionsgrenze überschreitet. Kleinere C_p -Werte bedeuten höhere Konzentrationen und umgekehrt. Um eventuelle Mengenunterschiede der eingesetzten cDNA auszugleichen, wurden die C_p -Werte der zu vergleichenden Transkripte gegen die C_p -Werte des Gyrase-Gen-Transkripts *gyrA* der zu vergleichenden Stämme unter Verwendung der LightCycler-Software (Version 4.0, Roche) normalisiert. Nach Durchlaufen der eingestellten Zyklenzahl wurde eine Schmelzkurven-Analyse des entstandenen PCR-Produktes durchgeführt, um eine Aussage über die Homogenität des Amplifikates zu treffen und so Verunreinigungen zu detektieren. Jedes der realtime Experimente wurde mit je zwei RNA-Isolaten aus getrennt angezogenen Kulturen der zu vergleichenden Stämme durchgeführt. Der Mittelwert aus beiden Experimenten wurde letztendlich zur Berechnung des C_p -Unterschiedes herangezogen. Der berechnete Unterschied wurde aufgrund der theoretischen Verdopplung der DNA-Menge pro PCR-Zyklus zur Basis von 2 logarithmiert. Der erhaltene Wert entspricht dem Verhältnis der eingesetzten und normalisierten cDNAs und somit dem Verhältnis der Transkriptmengen in den zu vergleichenden Stämmen.

Die Anzucht der zu vergleichenden Stämme, sowie die Isolierung, Aufreinigung und Begutachtung der Gesamt-RNA wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Danach erfolgte eine Kontroll-PCR als Taq-Standardansatz von 50 µl zum Ausschluss des Vorhandenseins von chromosomaler DNA auf 200 ng der isolierten Gesamt-RNA jedes Stammes mit den Primer-Paaren, welche auch zur späteren realtime PCR eingesetzt wurden. Dies entsprach einem 32-fachen Überschuß im Vergleich zur bei der späteren realtime PCR eingesetzten cDNA-Menge. 1 µg der isolierten Gesamt-RNA wurde anschließend in einer 20 µl-RT-Reaktion unter Verwendung von Random-Hexamer-Primern (Roche) in cDNA umgeschrieben. Von den RT-Ansätzen wurden 1:100-Verdünnungen in DEPC-Wasser (Ambion) angefertigt und die Ansätze zur realtime PCR in 20 µl-Glaskapillaren pipettiert. Zum Einsatz kam hierbei ein Puffer, welcher SYBR Green, Ex Taq Hot Start DNA-Polymerase, dNTPs und Puffer-Komponenten enthielt (SYBR Premix Ex Taq, TaKaRa, USA). Zusätzlich wurde noch ein Ansatz ohne Template-cDNA pipettiert um Verunreinigungen in den Komponenten auszuschließen. In der Tabelle 3.19 beschriebene Ansätze wurde jeweils zweifach pipettiert:

Tabelle 3.19: Reaktionsansätze zur realtime PCR

Stamm	Komponente	Menge [µl]
1 und 2 (zu testendes Transkript)	SYBR Premix Ex Taq (2 x)	10
	Primer 1 (50 pM/µl)	0,4
	Primer 2 (50 pM/µl)	0,4
	H ₂ O	4,2
	Template (2,5 ng/µl)	5

1 und 2 (cDNA-Mengenkontrolle)	SYBR Premix Ex Taq (2x)	10
	Primer RTgyrAf (50 pM/μl)	0,4
	Primer RTgyrAr (50 pM/μl)	0,4
	H ₂ O	4,2
	Template (2,5 ng/μl)	5
Wasserkontrolle ohne cDNA	SYBR Premix Ex Taq (2 x)	10
	Primer 1 (50 pM/μl)	0,4
	Primer 2 (50 pM/μl)	0,4
	H ₂ O	9,2

Tabelle 3.20: Programm zur realtime PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Anstieg (T) [°C/s]	Zeit [s]
1. Denaturierung	95	20	20
2. Denaturierung	95	20	5
3. Primer-Annealing und Elongation	60	20	20 ¹
4. Schmelzkurve Schritt 1	95	20	0
5. Schmelzkurve Schritt 2	65	20	15
6. Schmelzkurve Schritt 3	95	0,1	0
7. Kühlung	45	20	30

¹) Die Schritte 2-3 wurden 40x wiederholt.

Nach der Durchführung der realtime PCR wurden, insofern alle Kontrollen ein zufriedenstellendes Resultat zeigten, die aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche erhaltenen, gemittelten C_p-Werte und die sich hieraus ergebenden Transkriptverhältnisse mit Hilfe der LightCycler Software 4.0 im „relative quantification“-Modus berechnet.

3.3.9 Bestimmung der 5′-Enden von mRNA durch 5′-RACE-Analyse (Rapid Amplification of 5′-cDNA Ends)

RACE ist eine Methode, welche zur Bestimmung von 5′- und 3′-Enden von RNA angewendet werden kann (Argaman *et al.*, 2001; Bensing *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode sowohl zur Identifikation von Transkriptionsstartpunkten als auch zur Bestimmung von den Enden der csRNAs verwendet.

Zuerst wurde die Gesamt-RNA des entsprechenden Stammes isoliert. Um die RNA der T4 RNA Ligase zugänglich zu machen, musste am 5′ Ende ein Pyrophosphat abgespalten werden. Hierzu wurde das Enzym Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP) verwendet. Zur Diskriminierung von intakten 5′-RNA-Enden und Degradationsprodukten, wurden zwei Ansätze benötigt: Ein TAP-behandelter und ein unbehandelter Ansatz. Im nächsten Schritt wurde ein RNA-Oligonukleotid bekannter Sequenz an die 5′-Enden der RNA ligiert. Die nachfolgende reverse Transkription erfolgte

mit einem genspezifischen Primer. Die Amplifikation wurde mit einem zum RNA-Oligonukleotid komplementären Primer und einem weiteren, genspezifischen Primer durchgeführt. Die erhaltenen Banden, welche nur in der TAP-behandelten Probe zu sehen waren, wurden sequenziert. Das erste Nukleotid nach dem 3'-Ende des ligierten RNA-Oligonukleotids stellte den zu identifizierenden Transkriptionsstart dar.

Isolierung von Gesamt-RNA

Die zur Bestimmung mittels 5'-RACE-Analyse benötigte RNA wurde isoliert, aufgereinigt, begutachtet und quantifiziert. Hierbei wurde jedoch auf eine Säulenaufreinigung verzichtet, um den Verlust von sehr kleinen Transkripten <100 bp zu minimieren.

Behandlung der RNA mit Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP)

Die isolierte RNA wurde im Folgenden in zwei Ansätzen weiterverwendet. In einem Ansatz wurde die RNA zur Abtrennung eines Pyrophosphats des am 5'-Ende liegenden Triphosphats mit TAP behandelt. Ein zweiter Ansatz wurde ohne TAP-Behandlung weiter verwendet. Die Abtrennung des Pyrophosphats war notwendig, um die mRNA als Substrat für die T4-RNA-Ligase zugänglich zu machen und somit die Ligation eines RNA-Oligonukleotids im folgenden Schritt zu ermöglichen. Durch diese beiden Ansätze konnte zwischen den gesuchten Transkriptionsstartpunkten und RNA-Abbauprodukten unterschieden werden. Zur Behandlung mit TAP wurde folgender Standardansatz unter Zusatz eines RNase-Inhibitors (SUPERaseIN, Ambion 20 U/μl) pipettiert und inkubiert:

Tabelle 3.21: Standardansatz zur TAP-Behandlung von mRNA

Ansatz mit TAP		Ansatz ohne TAP	
Komponente/Inkubation	Menge	Komponente/Inkubation	Menge
RNA (3 μg/ml)	5 μl	RNA (3 μg/ml)	5 μl
→ 5 min bei 55°C		→ 5 min bei 55°C	
DEPC-Wasser	34,5 μl	DEPC-Wasser	37 μl
SUPERaseIN (Ambion, 20/μl)	2 μl	SUPERaseIN (Ambion, 20/μl)	2 μl
10 x TAP-Puffer (Biozym)	5 μl	10xTAP-Puffer (Biozym)	5 μl
TAP (Biozym, 10 U/μl)	2,5 μl	-	-
→ Abspaltung: 60 min bei 37°C		→ Abspaltung: 60 min bei 37°C	

Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze phenolisiert, mit Ethanol präzipitert und in 55 μl DEPC-Wasser gelöst.

Ligation eines RNA-Oligonukleotids an die 5'-Enden der RNA

In einer Ligation mit T4-RNA-Ligase wurde das RNA-Oligonukleotid (5'-RACE-Analyse Adapter) an die 5'-Enden in beiden Ansätzen ligiert. Hierzu wurde folgender Standardansatz pipettiert und inkubiert:

Tabelle 3.22: Standardansatz zur Ligation von RNA

Ansatz mit TAP-behandelter RNA		Ansatz ohne TAP-Behandlung	
Komponente/Inkubation	Menge	Komponente/Inkubation	Menge
RNA (15 µg)	55 µl	RNA (15 µg)	55 µl
→ 5 min bei 55°C		→ 5 min bei 55°C	
RNA-Oligo „RACE“	5 µl	RNA-Oligo „RACE“	5 µl
→ Denaturierung: 5 min bei 95°C		→ Denaturierung: 5 min bei 95°C	
10 x RNA-Ligase-Puffer (NEB)	10 µl	10 x RNA-Ligase-Puffer (NEB)	10 µl
T4-RNA-Ligase (NEB, 20U/µl)	5 µl	T4-RNA-Ligase (NEB, 20 U/µl)	5 µl
SUPERaseIN (Ambion)	4 µl	SUPERaseIN (Ambion)	4 µl
DEPC-Wasser	21 µl	DEPC-Wasser	21 µl
→ Ligation bei 17°C über Nacht		→ Ligation bei 17°C über Nacht	

Zur Inaktivierung der T4-RNA-Ligase wurde der Ansatz im Anschluß phenolisiert, mit Ethanol präzipitiert und in 50 µl DEPC-Wasser gelöst.

RT-PCR mit genspezifischen Primern

Das Umschreiben von RNA in cDNA wurde mit 8,2 µl der RNA aus der T4-RNA-Ligase-Reaktion durchgeführt. Hierbei wurde jeweils ein für das Gen, von welchem der Transkriptionsstart bestimmt werden sollte, spezifischer Primer eingesetzt. Diese Primer waren in der Regel komplementär zu einem Sequenzabschnitt 20-30 bp stromabwärts des Translationsstartpunktes.

Amplifizierung der cDNA

Die hergestellte cDNA wurde in einer PCR (Taq-Standard) amplifiziert. Hierzu wurden 2-5 µl der RT-PCR eingesetzt. Als Primer kamen ein zum ligierten RNA-Oligonukleotid komplementärer Primer (RACE_PCR_5') und ein weiterer, genspezifischer Primer, welcher jedoch stromaufwärts des zuvor in der RT-PCR eingesetzten genspezifischen Primers lag, zum Einsatz. Standardmäßig wurde das Annealing bei 50°C für 40 s durchgeführt, eine Elongationszeit von 60 s gewählt und 40 Zyklen eingestellt.

Agarosegel-Analyse und Sequenzierung

Je 10 µl aus dem PCR-Ansatz der TAP-behandelten- und der TAP-unbehandelten Probe wurden zur Analyse auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Fragmente, welche nur in dem TAP-behandelten Ansatz sichtbar waren, wurden sequenziert.

3.3.10 Bestimmung der 3'-Enden von mRNA durch 3'-RACE (Rapid Amplification of 3'-cDNA Ends)

Bei der Bestimmung der 3'-Enden der RNA wurde ein abgewandeltes 5'-RACE-Analyse Protokoll verwendet. Bei diesem Protokoll soll ein RNA-Oligo am 3'-Ende der mRNA ligiert werden. Durch die reverse Transkription mit Primern, die zum ligierten Oligo komplementär sind, wird die mRNA in cDNA transkribiert. Die folgende PCR wurde mit Primern, die komplementär zum ligierten Oligo und der zu untersuchenden mRNA sind, durchgeführt.

Die **Isolierung der Gesamt-RNA** erfolgte wie bei einer 5'-RACE. Nach der Untersuchung der RNA-Qualität konnte die **Ligation des RNA-Oligos** (3'-RACE Adapter) durchgeführt werden. Dieses Oligo war an seinen 5'-Ende phosphoryliert und die Basenabfolge wurde revers-komplementär zum 5'-RACE-Analyse-Oligo gewählt. Die **reverse Transkription** (RT-PCR) wurde unter gleichen Bedingungen, wie bei der 5'-RACE-Analyse beschrieben, durchgeführt. Der zur reversen Transkription eingesetzte Primer (RACE_PCR_5) war komplementär zum ligierten Oligo.

Für die anschließende **PCR** wurde wieder der gleiche Primer (RACE_PCR_5) und ein genspezifischer Primer eingesetzt.

Die PCR Produkte wurden in pUC19 kloniert, in DH5α transformiert und die positiven Klone mit Hilfe einer Kolonie PCR identifiziert. Jeweils 10 positive Klone wurden sequenziert.

3.3.11 Northern Blot-Analyse

Bei dieser Methode können RNA-Moleküle sichtbar gemacht und ihre Größe bzw. Menge bestimmt werden. Die Gesamt-RNA wird elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Im Anschluß wird das Transkript mit einer zu seinem 5'-Ende komplementären Digoxigenin (DIG) markierten DNA-Sonde hybridisiert. Über einen DIG-spezifischen, mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP, Roche) wird das markierte Transkript mit Hilfe des kolorimetrischen Substrats NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride / 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate, Toluidine Salz) detektiert. Das BCIP ist das Substrat für die Alkalische Phosphatase. Nach Dephosphorylierung folgt eine Oxidationsreaktion

von BCIP, wobei das NBT reduziert wird. Beide Reaktionsprodukte ergeben eine dunkelblaue Färbung.

Zur Detektion der csRNAs mittels Northern-Analyse wurde Gesamt-RNA aus *Streptococcus pneumoniae* isoliert, DNaseI-verdaut und quantifiziert. Hierbei wurde auf eine Säulenaufreinigung mittels RNeasy Midi-Kits (Qiagen) verzichtet. Aus den Isolaten wurden 3 µg RNA für 15 min bei 65°C denaturiert und für 2 min in Eiswasser gestellt. Danach wurden die Proben mit 2 x RNA-Ladepuffer (Fermentas) vermischt und meistens auf einem denaturierenden 8% PAA Gel mit 6,4 M Harnstoff aufgeladen. Der Lauf erfolgte in TBE-Puffer bei 20 V/cm für 2,5 Stunden. Gelzusammensetzung siehe Tabelle 3.13.

In diesen acht prozentigen PAA-Gelen können nur RNA-Moleküle, die weniger als ca. 500 Basen besitzen, aufgetrennt werden. Um größere RNAs detektieren zu können, wurden Agarosegele mit 1 x MOPS-Puffer hergestellt und zudem mit Formaldehyd zu einer Endkonzentration von 2 % versetzt. Der Lauf erfolgte in MOPS-Puffer.

Nach der Elektroporation wurden die Gele kurz mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert. Der Transfer der aufgetrennten RNA auf eine positiv geladene Nylon Membran (Roche) wurde durch Semidry Blotting für 30 min bei 400 mA durchgeführt. Hierbei wurde das Gel mit der daraufliegenden Membran zwischen mehrere Schichten Whatman-Papier gelegt, wobei sich die Membran auf der Seite des positiven Pols befand. Die Whatman Papierschichten wurden in 0,5x TBE-Puffer getränkt und es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den Schichten befanden.

Nach erfolgtem Transfer wurde das Gel zur Kontrolle des Transfers mit Ethidiumbromid gefärbt und begutachtet. Die transferierte RNA wurde im Anschluß durch UV-Crosslinking (1200 µJ/cm², Crosslinker Modell BLX254, MWG Biotech, Ebersberg) auf der Nylon-membran gebunden. Es folgte eine Inkubation der Membran für 30 min in einem Hybridisierungssofen unter Rotation bei 50°C mit 20 ml vorgewärmten Prähybridisierungspuffer. Die Hybridisierung mit der 5'-DIG-markierten DNA-Sonde (10 pM/ml) wurde in 20 ml vorgewärmtem Hybridisierungspuffer bei 50°C über Nacht im Hybridisierungssofen bei Rotation durchgeführt. Alle weiteren Wasch- und Äquilibrationsschritte, das Blocken der Membran, sowie die Antikörperbehandlung mit Anti-DIG-AP fab-Fragment (Roche) wurden laut Protokoll der Firma Roche (DIG Wasch and Block Buffer Set) durchgeführt. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem kolorimetrischen Substrat NBT/BCIP. 80 µl wurden in 10 ml Detektionspuffer gelöst. Die Farbentwicklung auf der Membran wurde im Dunkeln bei langsamer Bewegung des Gefäßes durchgeführt und dauerte zwischen wenigen Minuten bis zu einer Stunde. Die Größenbestimmung der detektierten Signale erfolgte über eine Bestimmung der Lauflänge im Vergleich zu Fragmenten bekannter Größe.

Tabelle 3.23: Zur Northern-Analyse eingesetzte Lösungen

Lösung	Komponente	Konzentration/Menge
20 x SSC	NaCl	3 M
	Na ₃ -Citrat x 2H ₂ O	0,3 M
TBE-Puffer (5 x)	EDTA	10 mM
	Borsäure	445 mM
	Tris	445 mM
Prähybridisierungspuffer	SDS	5 % (w/v)
	Na ₂ PO ₄	200 mM
	Blocking Reagent (Roche)	2 % (v/v)
Hybridisierungspuffer	Prähybridisierungspuffer	20 ml
	5'-DIG-markierte DNA-Sonde	10 pM/ml
5'-DIG-markierte DNA-Sonde		100 µM
Anti-DIG-AP-fab Fragment (Roche)		0,75 U/µl
		6 µl / 30 ml Blocking Puffer
DIG Wasch and Block Buffer Set (Roche)		
NBT/BCIP		80 µl/10ml Detektions-Puffer
1 x MOPS-Puffer	MOPS	40 mM
	Na-Acetat	10 mM
	EDTA pH 7, eingestellt mit NaOH	1 mM

3.3.12 Konstruktion des RNA-Markers

Ein RNA Marker von 70, 100, 150 und 200 Nukleotiden wurde durch *in vitro* Transkription von RNA mittels T7 RNA-Polymerase hergestellt. Als Template für die Synthese wurden PCR Fragmente eingesetzt, die den T7 Promotor trugen. Diese Fragmente wurden aus dem Plasmid pBluescript KS+ amplifiziert. Der 5'-Primer war für alle 4 Fragmente stets der Gleiche. Die 3'-Primer wurden so gewählt, dass ausgehend vom T7 Promotor run-off Transkripte mit erwünschter Größe produziert werden konnten.

In der Abbildung 3.1 sind schematisch die als Template für die T7 RNA Polymerase Reaktion eingesetzten PCR Produkte dargestellt.

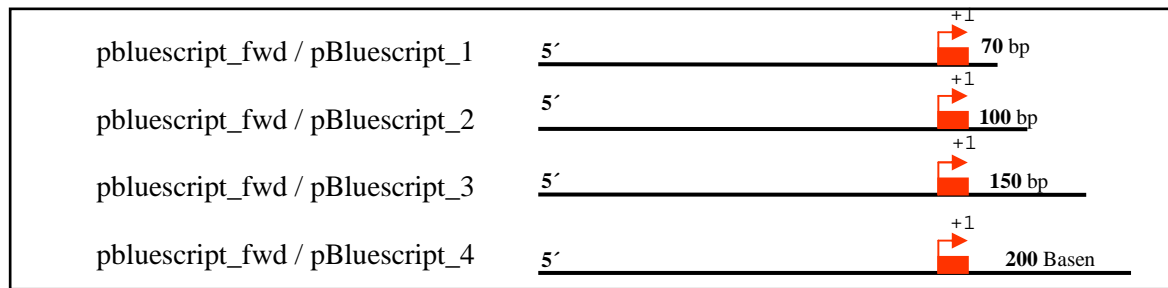


Abbildung 3.1: Zur Synthese des RNA-Markers eingesetzte Templates. Die PCR-Fragmente betragen eine Größe von 2388, 2418, 2468 und 2518 bp. Die zur Amplifikation verwendete Primerpaare sind in der Abbildung links zu finden. Die roten Pfeile symbolisieren den Promotor der T7 RNA-Polymerase. Die Größe der run-off Transkripte, ausgehend vom T7 RNA-Polymerase-Promotor sind angegeben.

Zur Synthese der run-off Transkripte wurde die Methode der *in vitro*-Transkription angewendet, wobei die Reaktionsansätze 20 µl betrugen.

Um diese Transkripte durch Northern Blot-Analyse detektieren zu können, wurde ein 47 Basenpaare langes DNA Oligonukleotid designt. Dieses Oligonukleotid war an seinem 5'-Ende mit Digoxigenin markiert und komplementär zu den ersten 47 Basen aller produzierten Marker RNAs. Somit war eine Detektion aller Fragmente mit einer Sonde möglich. Die einzelnen Größenfragmente wurden in einem Mengenverhältnis von 1 zu 1 vermischt und soweit verdünnt, dass die Detektion unter gleichen Bedingungen wie die kleinen RNAs erfolgen konnte. Der Marker wurde mit 2x RNA Loading Dye versetzt, portioniert und bei -20 °C eingefroren.

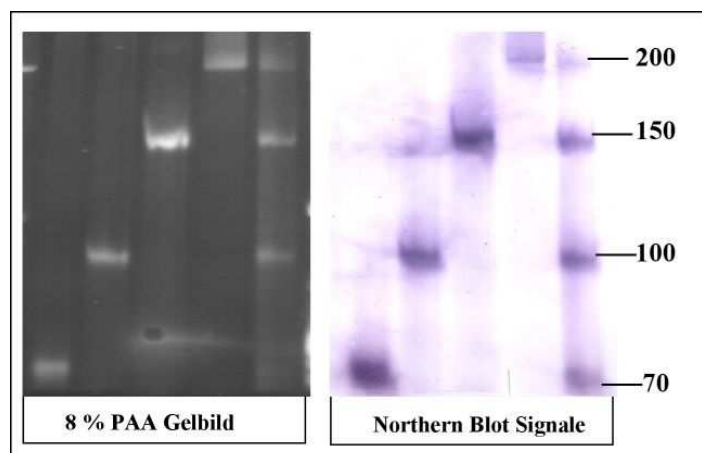


Abbildung 3.2: Northern Blot des hergestellten RNA-Markers. Das linke Bild zeigt das Ethidium Bromid gefärbte PAA-Gel. Die RNA- Banden 70, 100, 150 und 200 sind deutlich erkennbar. Diese Banden sind auf dem Northern Blot auch definiert erkennbar.

3.4 Mikroarray-gestützte globale Transkriptomanalyse

Durch die globale Transkriptomanalyse verschiedener Stämme können verändert exprimierte Gene identifiziert werden. Mittels Mikroarraytechnologie sollten in dieser Arbeit Zielgene für die kleinen regulatorischen RNAs identifiziert werden.

3.4.1 Das Oligo-Set für *Streptococcus pneumoniae* R6

Kombiniertes *Streptococcus pneumoniae* R6/TIGR4 Oligo-Set

Im Nano & Bio-Center der TU Kaiserslautern wurde ein Oligo-Set designt, welches neben 2347 für alle in R6 annotierten Gene spezifischen Oligos, auch für intergenische Bereiche spezifische 70mer Oligonukleotide enthielt (www.nbz.uni-kl.de/de/bio/microarray/R6tigr4oligos.html). Zudem enthielt das Oligo-Set weitere 616 Oligos, von welchen 488 spezifisch für Gene und intergene Bereiche in *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 waren, 44 spezifisch für tRNAs und repetitiven Sequenzen waren und 84 Oligos Positiv-, Negativ- und Stringenzkontrollen darstellten. Am 5'-Ende besaßen die Oligos einen Amino-C6-Linker. Die Oligos befanden sich in 9 Mikrotiterplatten als 10 µM Lösung in Spotpuffer. Die Platten wurden bei -20°C, versiegelt mit Adhäsionsfolie (SealPlate, EXCEL Scientific), aufbewahrt.

3.4.2 Herstellung der Mikroarray-Slides

Zur Herstellung der Mikroarray-Slides wurde ein SpotArray24 Microarray Spotting System von PerkinElmer und 32 SMP3-Pins (Telechem) verwendet. Das eingesetzte Spotting System verwendet das Kontaktverfahren zum Aufbringen der Oligos auf Epoxy-Slides (Schott Nexterion slide E). Die Steuerung des Herstellungsprozesses wurde über die zugehörige SpotArray-Software (PerkinElmer) vorgenommen. Vor Beginn des Spottings wurden die eingesetzten Epoxy-Slides mit einem Diamantschreiber beschriftet. Die Slides wurden in die Spottingkammer verbracht, die Mikrotiterplatten mit den Oligos aufgetaut und bei 800xg und 4°C für 2 min zentrifugiert. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Platten bei 4°C gelagert. Folgende Parameter wurden mittels der SpotArray-Software eingestellt (Tabelle 3.24).

Tabelle 3.24: Spotting Protokoll der ScanArray-Software

Parameter	R6/TIGR4 Chipset
Number of plates per plate change	3
Read barcodes on plates	no

Read barcodes on substrates	no
Number of pre-prints after each sample load	10
Pre-print spot spacing, center to center [μm]	500
Number of times to print each spot within array	2
Nominal spot diameter [μm]	150
Spot spacing, center to center [μm]	345
Location on array on substrate	center
Leave space for a barcode/label on bottom	yes
Printing approach velocity [mm/s]	10
Printing departure velocity [mm/s]	10
Printing overtravel [μm]	0
Printing dwell time [ms]	400
Sample load overtravel [μm]	100
Sample load dwell time [ms]	2500
Substrate thickness [mm]	1,1
Maximum number of spots per sample load	120
Speed of printhead X-Y motion	fast
Lenght of wash procedure [s]	6
Number of times to wash	4
Lenght of dry procedure after washing [s]	3
Do not print when humidity is outside of acceptable range	yes
Minimum acceptable humidity [%RH] ¹	50
Maximum acceptable humidity [%RH] ¹	70
Control humidity level during printing procedure	yes
Target humidity level [%RH] ¹	65
Do not print when temperature is outside of acceptable range	yes

¹) RH=relative humidity

Nach der Durchführung des Spottings wurden die Slides für 30 min in einer Feuchtekammer bei RT inkubiert und im Anschluß 60 min bei 85°C gebacken. Diese beiden Schritte bewirkten die Immobilisierung der gespotteten Oligos durch Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen der Amino-C6-Gruppe am 5'-Ende der Oligos und der Epoxy-Gruppe auf der Slideoberfläche. Vom Spotting wurde automatisch ein sogenanntes *.gal-File erstellt, in welchem die genaue Position jedes einzelnen Oligos auf dem Slide festgehalten und welcher für die Auswertung der Transkriptomanalysen herangezogen wurde.

Auf den so hergestellten Slides befanden sich alle Oligos und Pufferkontrollen in je zweifacher Ausführung und in einer zuvor festgelegten Anordnung. Die Anordnung der genspezifischen Oligos entsprach hierbei absichtlich nicht ihrer Abfolge im Genom von *Streptococcus pneumoniae*.

Tabelle 3.25: Zur Herstellung der Mikroarray-Slides eingesetzte Puffer

Lösung	Komponente	Konzentration
Spotpuffer	SSC	3 x
	Betain	1,5 M

3.4.3 Markierung von Gesamt-RNA aus *Streptococcus pneumoniae*

Um die Veränderungen im Transkriptom der csRNA Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtypstamm aufzudecken, müssen beide RNA-Isolate mit verschiedenen Fluorophoren markiert werden. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Fluorophore waren Cy3 und Cy5 (PerkinElmer) und wurden in Form gelabelter dCTPs im Zuge einer reversen Transkription der isolierten Gesamt-RNA in die entstehende cDNA eingebaut.

Die zur Markierung eingesetzten RNA-Isolate aus dem zu untersuchenden Stamm 1, sowie dem Referenzstamm 2 wurden aus je 100 ml Kulturen bei Nephelo 50 isoliert. Zur Markierung wurden je 2 x 54 µg RNA beider Stämme eingesetzt. Hierbei wurden 54 µg RNA von Stamm 1 mit Cy3 und 54 µg RNA von Stamm 1 mit Cy5 markiert. Mit zwei Ansätzen zu 54 µg RNA von Stamm 2 wurde ebenso verfahren. Die Markierung der insgesamt 4 Ansätze in einer reversen Transkription wurde unter Verwendung des LabelStar Array Kits (Qiagen) laut Herstellerangaben durchgeführt. Als Primer kamen hier Random-Octamerprimer (Endkonzentration 2 µM; MWG) zum Einsatz.

Die Aufreinigung der Markierungsansätze erfolgte unter Verwendung des LabelStar Array Kits (Qiagen) und wurde laut Herstellerangaben durchgeführt. Die 4 Ansätze wurden nach ihrer Aufreinigung in je 20 µl Elutionspuffer (LabelStar Array Kit) eluiert und bis zur Hybridisierung bei -80°C aufbewahrt.

3.4.4 Hybridisierung

Die Ansätze mit markierter cDNA wurden zur Hybridisierung mit den Oligo-Slides verwendet. Hierbei wurde die Cy3-markierte cDNA von Stamm 1 zusammen mit der Cy5-markierten cDNA von Stamm 2 in einer Hybridisierung auf einem Slide eingesetzt. Parallel hierzu wurde die Cy5-markierte cDNA von Stamm 1 zusammen mit der Cy3-markierten cDNA von Stamm 2 in einer weiteren Hybridisierung eingesetzt. Dieser sogenannte DyeSwap stellt eine interne Kontrolle der Ergebnisse dar. Zugleich verdoppelt sich hierdurch die zur statistischen Auswertung verfügbare Menge an Daten, wodurch die Statistik an sich an Aussagekraft gewinnt. Die maschinelle Hybridisierung wurde in einer Hybridisierstation der Firma Tecan (HS400) durchgeführt.

Vor der Hybridisierung wurden die vier markierten cDNA-Isolate in einer SpeedVac unter Lichtausschluß getrocknet. Die zu vergleichenden Proben wurden paarweise in insgesamt 10 µl H₂O aufgenommen (Cy3-markierte cDNA von Stamm 1 mit Cy5-markierter cDNA von Stamm 2, sowie Cy5-markierte cDNA von Stamm 1 mit Cy3-markierter cDNA von Stamm 2). Zu den so hergestellten beiden Hybridisierungsansätzen wurden je 90 µl Hybridisierungspuffer (Nexterion Hyb und Formamid, 1:1) gegeben und vermischt. Die Ansätze wurden für 5 min bei 96°C denaturiert und bei dem Schritt „Probeninjektion“ zur Hybridisierung mit den Oligos auf den Mikroarray-Slides zugegeben. Das an der Hybridisierungsstation eingestellte Hybridisierungsprotokoll ist in Tabelle 3.26 dargestellt. Im Anschluß an die Hybridisierung wurden die hybridisierten Slides bis zum Einscannen in der Stickstoffatmosphäre der Hybridisierungsstation unter Lichtausschluß belassen.

Tabelle 3.26: Hybridisierungsprotokoll

Komponente	Waschdauer [min]	Applikationsdauer	Temperatur [°C]	Zyklen
0,1 % SDS	0,5	0,5 min	25	
H ₂ O	0,5		25	
Prähybridisierungspuffer	0,5	30 min	42	
Prähybridisierungspuffer	0,5		40	
Probeninjektion			40	
Hybridisierung		16 h	40	
2 x SSC, 0,1 % SDS	1	0,5 min		2
1 x SSC	1	0,5 min		2
0,1 x SSC	1	0,5 min		
Trocknen		3 min	30	
	Aufbewahrung in Stickstoffatmosphäre bis zum Scannen			

Tabelle 3.27: Zur Hybridisierung eingesetzte Puffer

Lösung	Komponente	Konzentration
Prähybridisierungspuffer	SSC	5 x
	SDS	0,1 % (w/v)
	BSA	0,5 mg/ml
Hybridisierungspuffer	Nexterion Hyb/Formamid 1:1	
0,1 % SDS	SDS	0,1 % (w/v) in H ₂ O
0,1 % SDS 2 x SSC	SDS	0,1 % (w/v)
	SSC	2 x in H ₂ O
1 x SSC	SSC	1 x in H ₂ O

Nach der so durchgeführten Hybridisierung konnten nunmehr 2 hybridisierte Slides gescannt und analysiert werden. Slide 1 lieferte den Vergleich von Cy3-markierter cDNA von Stamm 1 und Cy5-

markierter cDNA von Stamm 2 und Slide 2 lieferte den Vergleich von Cy5-markierter cDNA von Stamm 1 und Cy3-markierter cDNA von Stamm 2.

3.4.5 Scannen und Analyse der Hybridisierungen

Scannen der hybridisierten Slides

Die Ergebnisse der Hybridisierungen wurden als *.tiff-Dateien in einem ScanArray4000 Microarray Analysis System erfasst. Durch Anregung der Cy3-markierten cDNA durch einen Laser der Wellenlänge 550 nm und Anregung der Cy5-markierten cDNA durch einen Laser der Wellenlänge 633 nm erfolgte hierbei das Scannen der hybridisierten Slides. Die Steuerung des Scannes erfolgte durch die ScanArray Express Software 2.1. Unter Verwendung der EasyScan-Option wurden die Slides zunächst mit einer niedrigen Auflösung von 50 μ M gescannt, wobei die Photomultiplier Tube-Stärke (PMT) in der Form justiert wurde, daß beide Fluoreszenzkanäle in etwa die gleichen Signalintensitäten lieferten. Unter Verwendung der so ermittelten PMT-Werte wurden die hybridisierten Slides im Anschluß mit einer Auflösung von 10 μ m gescannt.

Analyse der Hybridisierungen

Zur Analyse der eingescannten Slides wurde zunächst die EasyQuant-Methode der ScanArray Express Software verwendet. Hierzu wurden die eingescannten *.tiff-Dateien der hybridisierten Slides und die bei dem Spotting der Slides erstellte *.gal-Datei, welche die genaue Position jedes Oligos auf dem Slide und so die Information zum komplementären Gen in *Streptococcus pneumoniae* R6 liefert, benötigt. Die Quantifizierung der gemessenen Cy3- und Cy5-Intensitäten erfolgte durch die Adaptive circle-Option der Software. Die zur Normalisierung eingestellte Methode war LOWESS (Locally Weighted Scatter Plot Smoothing, Yang *et al.*, 2001). Das Ergebnis der Quantifizierung wurde als *.csv-Datei gespeichert und in Excel weiterverarbeitet. Nach Überprüfung der Kontrollspots wurden diese aus der Ergebnisdatei entfernt und separat gespeichert. Spots, deren Intensität zu gering war, also ein Verhältnis Signal/Hintergrund von < 3 hatten, wurden gelöscht. Spots, welche durch die ScanArray Express Software als unbrauchbar bezeichnet wurden, wurden nach manueller Überprüfung ebenfalls gelöscht. Die modifizierte Ergebnisdatei wurde gespeichert und unter Verwendung der auf der Internetseite des Nano & Bio-Center der TU Kaiserslautern (www.nbc3.biologie.uni-kl.de/) bereitgestellten Anwendungen ausgewertet. Zur Auswertung standen durch die zuvor beschriebene Hybridisierung je vier Werte der gescannten Signalintensitäten aus den Stämmen 1 und 2 von jedem der durch komplementäre Oligos erfassten Gene aus *Streptococcus pneumoniae* R6 zur Verfügung. Zwei Werte ergaben sich alleine aus der Tatsache, daß jedes Oligo zweifach auf den Slides vorhanden war. Zwei Weitere ergaben sich durch die parallel laufenden Ansätze der Hybridisierung mit unterschiedlich markierter cDNA der beiden Stämme (Dye Swap).

Alle Werte wurden in eine Excel-Datei kopiert und entsprechend der Vorgaben (www.nbc3.biologie.uni-kl.de/) formatiert. Alle Intensitätswert-Verhältnisse wurden danach unter Verwendung der Global Loess-Funktion (www.nbc3.biologie.uni-kl.de/ → Microarray → Normalization → Global) normalisiert. Die normalisierten Verhältnisse wurden wiederum in eine Excel-Datei kopiert und nach entsprechender Formatierung (www.nbc3.biologie.uni-kl.de/) mit der Funktion Ratio-Testing (www.nbc3.biologie.uni-kl.de/ → Microarray → Testing → Ratios) analysiert. Hierdurch wurden die Gene mit signifikant veränderten Transkriptmengen in den verglichenen Stämmen 1 und 2 ermittelt. Es handelte sich hierbei um eine auf einem t-test basierende Signifikanztestung. Von den Verhältnissen der gescannten Intensitäten aus Stamm 1 und 2 wurden Logarithmen berechnet. Dies war notwendig, da sich Verhältnisse nicht normal, sondern log-normal verteilen (Limpert *et al.*, 2001). Entsprachen die berechneten Logarithmen der Verhältnisse einer log-normalen Verteilung, so wurde mit ihnen ein t-test durchgeführt. Dieser Test lieferte ein Konfidenzintervall für den wahren Wert des Verhältnisses und einen P-Wert für jedes Gen (Limpert *et al.*, 2001). Aus den P-Werten werden angepasste P-Werte berechnet, anhand welcher die False Discovery Rate (FDR, Benjamini & Hochberg, 1995) und der Family Wise Error Rate (FWER, Dudoit *et al.*, 2002) abgeschätzt werden können. Bei der Analyse der Mikroarraydaten in der vorliegenden Arbeit wurden nur solche Gene als signifikant angesehen, welche einen adjustierten P-Wert $<0,01$, also welche eine sogenannte False Discovery Rate (FDR) von kleiner als 1 % besaßen. Um zusätzlich auch die biologische Signifikanz der so als signifikant differentiell exprimiert ermittelten Gene zu gewährleisten, wurden nur Gene berücksichtigt, welche eine 2-fach erhöhte- bzw. erniedrigte Transkriptmenge (Verhältnis >2 oder $<0,5$) zeigten.

Die beschriebene Transkriptomanalyse der zwei zu vergleichenden Stämme wurde mit drei voneinander getrennt angezogenen Kulturen beider Stämme durchgeführt. Somit standen zur statistischen Auswertung 12 Intensitätswerte der gemessenen Transkripte jedes Stammes zur Verfügung.

3.5 Klonierung von DNA-Fragmenten

In dieser Arbeit wurden verschiedene DNA Fragmente in verschiedene Plasmide kloniert. Die dabei durchgeführten Schritte werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.5.1 Amplifikation

Die Amplifikation der DNA Fragmente erfolgte mittels PCR unter Verwendung der Taq- oder der iProof Polymersae.

3.5.2 Restriktion

PCR-Produkte, Plasmide oder chromosomale DNA wurden, wenn notwendig, um für eine Ligation komplementäre Überhänge zu erhalten, mit TypII-Restriktionsendonukleasen verdaut. Es wurden jedoch auch blunt end Ligationen durchgeführt. Die Verdauung erfolgte in den von den Herstellern angegebenen Reaktionspuffern und Temperaturen.

Aufgrund der Enzym-hemmenden Wirkung des Glycerins in den Enzym-Stocklösungen betrug die zugegebene Enzymmenge maximal 10 % des Gesamtvolumens des jeweiligen Ansatzes. Die Inkubationszeit betrug zwischen 2 bis 3 Stunden. Nach erfolgreichem Verdau wurden präparative Ansätze, welche also weiterverwendet werden sollten, mit dem JETquick PCR Purification Kit 250 aufgereinigt. Analytische Ansätze wurden ohne weitere Behandlung direkt zur Analyse mittels Agarosegelelektrophorese eingesetzt.

3.5.3 T4 DNA-Polymerase Reaktion

PCR-Produkte, die mit der Taq-Polymerase produziert wurden, besitzen A-Überhänge an ihren 3'-Enden. Um diese PCR-Produkte in einem blunt end geschnittenem Vektor (pUC19 / SmaI) klonieren zu können, mussten die Enden mit der T4 DNA-Polymerase verdaut werden. Die Polymerase wird von dem Phagen T4 codiert. Dieses Enzym verfügt über die 3'-5'-Exonuclease-Aktivität und braucht um diese Reaktion durchführen zu können einen 3'-Einzelstrang-Überhang. Das Enzym führt zudem bei Vorhandensein von dNTPs im Reaktionsansatz eine 5'-3' Polymerase-Aktivität durch.

Die PCR-Produkte wurden zuerst mit dem Jetquick PCR Purification Kit 250 aufgereinigt. Die Elution des Produkts erfolgte mit 35 µl H₂O. Für die nachfolgende T4-DNA-Polymerase Reaktion wurden 34 µl PCR-Produkt eingesetzt. Der genaue Ansatz ist aus der Tabelle 3.27 zu entnehmen. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde das Enzym 10 min bei 70 °C denaturiert und schließlich mit dem Jetquick PCR Purification Kit 250 aufgereinigt.

Tabelle 3.28: Standardansatz für eine T4-DNA-Polymerase Reaktion

Komponente	Menge
dNTP's (10 mM)	1 µl
PCR-Produkt	34 µl
T4 DNA-Polymerase (3U/µl)	1 µl
Puffer B (10x)	4 µl
Gesamtvolumen	40 µl

3.5.4 Phosphorylierung

Um eine blunt end Ligation von PCR-Produkten mit blunt end geschnittenem und dephosphoryliertem Vektor durchführen zu können, mussten die PCR-Produkte an ihren 5'-Enden phosphoryliert werden. Hierdurch kommt es bei der Ligation mit dephosphoryliertem Vektor zur Bildung einer Phosphodiesterbindung durch die T4 DNA-Ligase. Für die Phosphorylierung wurde das Enzym Polynukleotid-Kinase (PNK, Roche) verwendet. Das Enzym wurde unter den in der Tabelle 3.29 aufgeführten Bedingungen eingesetzt.

Tabelle 3.29: Phosphorylierungsansatz mit PNK

Komponente	Volumen
PCR-Produkt	33 µl
10 x Phosphorylierungspuffer (Roche)	4 µl
ATP (20 pM)	1 µl
PNK 10 U/µl	2 µl
Gesamtvolumen	40 µl

Der Phosphorylierungsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und mit dem Jetquick PCR Purification Kit 250 aufgereinigt.

3.5.5 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (1 U/µl, Invitrogen) verwendet. Dieses Enzym verknüpft freie 3'-OH-Gruppen eines DNA-Fragments mit 5'-Phosphatgruppen eines anderen (oder des gleichen bei Plasmiden) DNA-Fragments. Die linearisierten Plasmide und die Inserts wurden auf einem Agarosegel aufgetragen und ihr Mengenverhältnis abgeschätzt. Im Ligationsansatz wurde letztendlich ein Mengenvhältnis von 1:1 bis 1:10 Plasmid:Insert eingesetzt.

Tabelle 3.30: Standardansatz zur Ligation mit T4-DNA-Ligase

linearisierter Vektor	x µl
Insert	x ml
5 x Ligase-Puffer (Invitrogen)	4 µl
T4-DNA-Ligase (1 U/µl)	1 µl
H ₂ O Millipore	ad 20 µl

Die Blunt-End-Ligation erfolgte über Nacht bei einer Temperatur von 18°C. Die Ligation von kohäsiven Enden wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach der Ligation wurde ein Teil der Ansätze in *E. coli* DH5 α transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte in dieser Arbeit auf Ampicillin (100 μ g/ml). Bei Klonierungen in oder vor das β -Galaktosidase Gen wurde den Platten X-Gal (60 μ g/ml) beigesetzt. Die Untersuchung der Klone erfolgte mittels Kolonie PCR, Plasmid-Mini-Präparationen und analytischem Verdau.

3.6 Deletion von Genen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die csRNA Gene deletiert und durch folgende Resistenzkassetten ersetzt.

***aad9*-Kassette**

Die *aad9*-Kassette (GenBank Nr. M69221) ist ein von LeBlanc *et al.*, 1991 aus *Enterococcus faecalis* isoliertes und charakterisiertes 1158 bp *Cla*I-*Nde*I-Fragment, auf welchem die Spectinomycin-Adenyltransferase AAD(9) durch das *aad9*-Gen kodiert ist. AAD(9) katalysiert den Transfer von AMP unter Hydrolyse von ATP auf das Spectinomycin, welches hierdurch inaktiviert wird. Die *aad9*-Kassette wurde in der vorliegenden Arbeit als *Nhe*I-Fragment amplifiziert und verwendet.

***ermAM*-Kassette**

Die *ermAM*-Kassette (GenBank Nr. Y00116) aus dem *Streptococcus faecalis*-Plasmid pAM β 1 (Martin *et al.*, 1987) kodiert für eine 23S rRNA-Methylase (erythromycin resistance transmethylese) und verhindert durch Dimethylierung der 23S rRNA-Target-Site am Ribosom die Interaktion des Ribosoms mit Erythromycin. Das hier verwendete Fragment entsprach den Positionen von 103 bp bis 1047 bp der Genbanksequenz.

***aphIII*-Kassette**

Die *aphIII*-Kassette (GenBank Nr. V01547) kodiert für eine 3'5"-Aminoglycosid Phosphotransferase (Trieu-Cuot und Courvalin, 1983) und vermittelt eine Kanamycinresistenz. Das Fragment von Position 513 bp bis 1383 bp der publizierten Sequenz wurde verwendet.

***cat*-Kassette**

Die *cat*-Kassette (Brückner *et al.*, 1984) wurde für diese Arbeit modifiziert. Ein 818 bp promotorloses *cat*-Fragment wurde mit den Primern *cat*1 und *cat*2 amplifiziert. Das Fragment begann 21 bp stromaufwärts des Gens (bp 188, GenBank Nr. X02872) und endete 150 bp stromabwärts des Gens (bp 104, GenBank Nr. X63072). Das 237 bp *vegM*-Promotorfragment (Halfmann *et al.*, 2007a) wurde mit den Primern *veg*5 und *pVeg*2 amplifiziert. Die Primer *cat*1 und *pVeg*2 besaßen überlappende

Überhänge. Die neue Chloramphenicol-Resistenz-vermittelnde Kasette wurde in einer überlappenden PCR mit den Primern veg5 und cat2 amplifiziert. Diese beiden Primer besaßen *SphI* Überhänge. Dieses *SphI*-Fragment wurde schließlich in pUC18 kloniert und sequenziert.

***tetM*-Kassette**

Die *tetM*-Kassette aus *Streptococcus mitis* B6 (König *et al.*, 1998) wurde nicht zur Deletion von Genen verwendet. Diese Kasette ist Bestandteil der Plasmide pPP2, pTP2 und pTP3, die zur Expressionsbestimmung von Genen in *Streptococcus pneumoniae* verwendet wurden. Das *tetM*-Gen kodiert für ein ribosomales Schutzprotein, welches die Inhibition der Interaktion von Aminoacyl-tRNA mit der 30S-Untereinheit der Ribosomen verhindert.

3.7 Bestimmung der Expression von Genen

Die Bestimmung der Expression verschiedener Gene spielte in der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle. Von Interesse waren sowohl die Bestimmung der Aktivität verschiedener Promotoren als auch die Translationsstärke vieler Proteine. Für diese Analyse wurden die Plasmide pPP2, pTP2 und pTP3 verwendet.

3.7.1 Das Pneumo Promotor Probe Plasmid pPP2

Zur Bestimmung von Promotor-Aktivitäten wurden die entsprechenden Promotor-Regionen in das integrative Pneumo-Promotor-Probe Plasmid pPP2 (GenBank Nr. EF061139, Halfmann *et al.*, 2007a) kloniert. Der Promotor des zu testenden Gens befand sich stromaufwärts eines promotorlosen β -Galaktosidase Gens (*lacZ*). Die Messung der β -Galaktosidaseaktivität erfolgte in einem modifizierten Miller-Assay.

Die Promotoren wurden als *SphI*-*BamHI*-Fragmente vor das β -Galaktosidase Gen *lacZ* kloniert. Die Selektion erfolgte in *E. coli* auf Ampicillin und X-Gal. Die positiven Klone wurden entweder durch Plasmid-Mini-Präparation und analytischem Verdau oder durch Kolonie-PCR mit den Primern MCS_fwd_Kontr und 274_lac identifiziert. Anschließend wurde eine Sequenzierung des Inserts mit diesem Primerpaar vorgenommen. Schließlich wurden die Reporterplasmide in die entsprechenden Stämmen von *S. pneumoniae* transformiert. Die Selektion der Transformanten von *S. pneumoniae* erfolgte auf Tetracyclin. Durch die Integration in das Genom von *S. pneumoniae* am *bgaA-gatC*-Lokus wurde das Gen der endogenen β -Galaktosidase von *S. pneumoniae* (*bgaA*) inaktiviert, womit die gemessenen Aktivitäten alleine der auf dem pPP2 kodierten β -Galaktosidase zuzuordnen waren. Die

Integration in *S. pneumoniae* wurde unter Verwendung der Primerpaare EII_fwd_Kontr / tetM_rev_Kontr und lacZ_fwd_Kontr / BgaA_rev_Kontr mittels PCR überprüft.

3.7.2 Das Pneumo Translations Probe Plasmid pTP2

Das Pneumo Translations Probe Plasmid pTP2 (GenBank Nr. EF061140) besitzt im Prinzip die gleiche Sequenz, wie das pPP2, bis auf die Region vor dem β -Galaktosidase Gen '*lacZ*. Das '*lacZ* enthält ebenfalls keinen Promotor. Zusätzlich fehlen die Signale zur Initiation der Translation und die Codons für die ersten acht Aminosäuren des Genprodukts von *lacZ*, der β -Galaktosidase.

Um die Translationssignale eines Gens untersuchen zu können, müssen dementsprechend der Promotor, die Signale zur Initiation der Translation und das Startcodon kloniert werden. Die ersten Codons des zu untersuchenden Gens wurden in frame mit '*lacZ* fusioniert.

3.7.3 Das Pneumo Translations Probe Plasmid pTP3

Dieses Plasmid wurde während dieser Arbeit konstruiert. Der Unterschied zum pTP2 besteht darin, dass dem Reporter gen '*lacZ* ein konstitutiv exprimierender Promotor vorgeschaltet wurde. Somit kann die Translationsaktivität der Genen mit Hilfe dieses Plasmids unabhängig von der Aktivität ihrer Promotoren untersucht werden.

Um einen mäßig aber konstitutiv exprimierenden Promotor zu erhalten, wurde der bereits bekannte *vegM*-Promotor (Halfmann *et al.*, 2007a) modifiziert. Die letzten beiden Basen TA vor der -10 Sequenz wurden in CT umgeändert (*vegW*, Halfmann Doktorarbeit). Außerdem veränderte sich die Region zwischen der -10 Region und dem +1. Hier wurde eine *PmeI*-Schnittstelle GTTTAAAC eingefügt. Die Schnittstelle beginnt zwei Basen stromabwärts der -10 Box. So werden die letzten vier Basen vor dem +1 aus CAAA in TTTA verändert. Dieser Promotor wurde *vegT* genannt.

Die Integration der *PmeI*-Schnittstelle in dieser Region ermöglicht eine *PmeI/BamHI*-Klonierung von Fragmenten. Das *vegT*-Promotorfragment wurde mit den Primern *veg5* und *vegW-PmeI-BamHI* amplifiziert. Als Template diente der *vegW*-Promotor. Das PCR Produkt wurde mit *SphI* und *BamHI* verdaut und an diesen Sites in pTP2 integriert. Für die Klonierung von Fragmenten zur Untersuchung von Translationssignalen kann die *PmeI*- und *BamHI*-Schnittstelle verwendet werden.

```

121                                     SphI
ATCATGGCGA CCACACCCGT CCTGTGGATC TATCGATGCA TGCTTGGACT CCTGTTGATA
GATCCAGTAA TGACCTCAGA ACTCCATCTG GATTTGTTCA GAACGCTCGG TTGCCGCCGG
GCGTTTTTTTA TTGGTGAGAA TCCAAGCTCG GAATTAATTC TCATGTTTGA CAGCTTATCA
TCGAATTATA GGAATAGAGC AAACAAGCAA AGGAAATTTT GTCAAAATAA TTTTATTGAC
-35
-10                               PmeI                               BamHI
AACGTCTTAT TAACTTGATA TAATTTGTTT AAACGTACGT AAGATCCCGT CGTTTTACAA
>>...'lacZ'...>
CGTCGTGACT GGGAAAACCC TGGCGTTACC CAACTTAATC GCCTTGCAGC ACATCCCCCT
480
>.....'lacZ'.....>

```

Abbildung 3.3: Die Region vor *lacZ* in pTP3. Die Region stromaufwärts des Reportergens *lacZ* ist gezeigt. Der gesamte *vegT*-Promotor ist unterstrichen. Das Promotorfragment wurde mit *SphI* und *BamHI* kloniert. Die -35 und die extended -10 Region sind gelb markiert. Die *PmeI*-Schnittstelle ist grün markiert. Das Enzym *PmeI* schneidet zwischen GTTT und AAAC. Das +1 des Promotors ist die erste klonierte Base. Am ungeschnittenen Vektor ist das +1 das erste A, welches hier fett markiert wurde.

3.7.4 β -Galaktosidase-Assay

Der β -Galaktosidase-Assay (Miller, 1972) basiert auf der Umsetzung von o-Nitrophenol- β -D-Galactopyranosid (ONPG) zu Galaktose und o-Nitrophenol (ONP), katalysiert durch das Enzym β -Galaktosidase. Das freiwerdende ONP bewirkt eine Gelbfärbung der Lösung, welche bei 420 nm im Photometer gemessen werden kann.

Die hier durchgeführten β -Galaktosidase-Assays wurden in einigen Punkten modifiziert. In dem veränderten Assay wird die spezifische Eigenschaft der Autolyse von *Streptococcus pneumoniae* ausgenutzt und durch die Zugabe von Triton-X-100 induziert. Zweitens wurde anstelle eines Endpunktassays, der Verlauf der Bildung des ONPs im Photometer als Kinetik der Zeit aufgezeichnet. Drittens wurde als Bezugsgröße für die β -Galaktosidaseaktivität nicht die Zelldichte, sondern die Proteinmenge im Reaktionsansatz herangezogen.

Messung in der exponentiellen und stationären Phase

Jeweils 2 ml Zellen bei Nephelo 70 und aus der stationären Phase (90 Minuten nach dem Erreichen der stationären Phase) wurden für 2 min bei 14000 rpm und RT in einer Eppendorffzentrifuge pelletiert und in 500 μ l Lysepuffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 5-10 min bei 37°C. Nach vollständiger Lyse wurden die entnommenen Proben auf Eiswasser gelagert. Zur Durchführung des Assays wurden 200 μ l Lysat oder geeignete Verdünnungen in eine Küvette der Weglänge 1 cm

gegeben und in einem auf 30°C geheizten Photometer (Uvikon 922 Spectrophotometer, Kontron Instruments) für 2 min vorgewärmt. Durch Zugabe von 800 µl ONPG-Lösung (1 mg/ml) wurde die Reaktion gestartet und die OD₄₂₀ in Intervallen von 30 s für 15 min bei 30°C gemessen. Als Referenz diente ein Ansatz mit 200 µl Lysepuffer und 800 µl ONPG-Lösung. Die gemessenen Werte für die Absorption bei 420 nm wurden gegen die Zeit aufgetragen und aus dem linearen Bereich der Geraden die Steigung bestimmt. Die Gesamt-Proteinkonzentration des Lysats wurde nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung von RotiQuant (Roche, Karlsruhe) bestimmt. Die Berechnung der β-Galaktosidaseaktivität erfolgte als Units in nmol freigesetztes ONP pro mg Protein pro Minute:

$$\text{Units} = \frac{s * V}{\epsilon * d * m} \quad [\text{nmol}/(\text{min} * \text{mg})]$$

d = Weglänge der Küvette = 1cm

ε = Absorptionskoeffizient von o-Nitrophenol bei 420 nm = 4,5 * 10³ l/mol * cm

m = Masse des Proteins im Ansatz [mg]

s = Steigung der Absorptions-Zeit-Geraden (ΔOD₄₂₀/Δt [1/min])

Tabelle 3.31: Zu β-Galaktosidase-Assays eingesetzte Lösungen

Lösung	Komponente	Konzentration/Menge
Z-Puffer	Na ₂ HPO ₄	60 mM
	NaH ₂ PO ₄	46 mM
	MgSO ₄	1 mM
	β-ME	2,7 ml/l
	H ₂ O	ad 1l
	pH 7, Lagerung bei 4°C	
Lysepuffer	Z-Puffer	
	Triton-X-100	0,1 % (v/v)
ONPG-Lösung	Z-Puffer	
	ONPG	1 mg/ml

Messung während des Wachstums

Um die Expression des *comC*-Gens verfolgen zu können, wurden β-Galaktosidase-Messungen während des Wachstums durchgeführt.

Hierzu wurden die Vorkulturen der Stämme in THB-Medium bis Nephelo 70 angezogen. 49 ml vorgewärmtes C-Medium wurde mit 1 ml aus dieser Vorkultur angeimpft und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die erste Probe (10 ml) wurde nach 100 min entnommen. Zu diesem Zeitpunkt besaß die Kultur eine Zelldichte von Nephelo 16 bis 20. Danach wurden bei den Zeitpunkten von 120 min (8 ml), 140 min (6 ml), 160 min (2 ml), 180 min (2 ml), 240 min (2 ml) und 300 min (2 ml) weitere Proben genommen.

Die Messung der β-Galaktosidaseaktivität und die Bradford-Assays wurden wie beschrieben durchgeführt.

3.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

(nach Laemmli, 1970)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde eine denaturierende, diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde eine vertikale Apparatur verwendet. Durch Zugabe von SDS werden die Proteine in Lösung denaturiert, d.h. die Auftrennung nach ihrer Größe wird nicht durch Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen beeinflusst. Zusätzlich werden die Proteine durch das SDS gleichmäßig negativ geladen, wodurch sie bei der Elektrophorese in Richtung Anode wandern

3.8.1 Herstellung der Gele und Elektrophorese

Die zur Elektrophorese benötigten Glasplatten wurden mit 0,1 % SDS, destilliertem Wasser und Ethanol gereinigt. Die beiden Glasplatten wurden, durch 1,2 mm dicke Spacer getrennt, aufeinander gelegt, mit Klammern fixiert und mit heißer, 2 %iger Agaroselösung an den Rändern abgedichtet. Zwischen die beiden Platten wurde zuerst das ca. 8 cm hohe Trenngel gegossen.

Tabelle 3.32: Trenngel (12 %)

Komponente	Konzentration/Menge
H ₂ O millipore	8,75 ml
Lower Tris	6,25 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1;Rotiphorese Gel30, Roth)	10 ml
TEMED	40 µl
APS 10 %	300 µl

Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurde das Trenngel mit 1 ml n-Butanol überschichtet. Sofort nach Erscheinen zweier klarer Linien an der Grenzschicht zwischen Trenngel und n-Butanol wurde das n-Butanol entfernt, die Oberfläche des Trenngels mit H₂O millipore gespült und mit Papier getrocknet. Auf das Trenngel wurde das ca. 2 cm hohe Sammelgel gegossen.

Tabelle 3.33: Sammelgel (3,3 %)

Komponente	Konzentration/Menge
H ₂ O millipore	6,4 ml
Upper Tris	2,5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1;Rotiphorese Gel30, Roth)	1,1 ml
TEMED	40 µl
APS 10 %	300 µl

Direkt nach dem Einfüllen zwischen die Glasplatten wurde ein Plexiglaskamm von oben zwischen die Glasplatten gesteckt, wobei die Zähne des Kammes vollständig und luftblasenfrei in die Lösung

eintauchen mussten. Nach ca. 45 min Polymerisation wurde der Kamm und der untere Spacer gezogen und das fertige Gel in eine vertikale Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Die Elektrophorese-Kammern wurden mit Laemmli-Puffer befüllt. Die Proben wurden mit 5 x SDS-Probenpuffer vermischt und nach 10 min Kochen bei 95 °C auf das Polyacrylamidgel geladen. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt für das Sammelgel und wurde beim Erreichen der Trennlinie von Sammel- und Trenngel durch die Bromphenolblau-Bande bei 200 Volt fortgesetzt. Nach dem Gellauf wurden die Glasplatten voneinander getrennt und das Trenngel zur Visualisierung der Proteinbanden gefärbt.

Tabelle 3.34: Zusammensetzung der bei der SDS-PAGE verwendeten Lösungen

5 x SDS-Probenpuffer	Tris-Cl pH6,8	0,225 M
	Glycerin	50 % (v/v)
	SDS	5 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
	Dithiothreitol	0,25 M
Upper Tris	Tris-HCl pH6,8	0,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
Lower Tris	Tris-HCl pH8,8	1,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
Laemmli-Puffer	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1 % (w/v)

3.8.2 Färbung der Proteingele

Nach Durchführung der Elektrophorese wurde das Trenngel für 10 min in Färbelösung geschwenkt und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Bis zum Abkühlen auf RT wurde das Gel weiter geschwenkt. Nach dem Abkühlen wurde die Färbelösung entfernt, das Gel mit Entfärbelösung überschichtet und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Dieser Vorgang wurde 2-3 mal wiederholt bis der Hintergrund entfärbt und die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Nach vollständigem Entfärben wurde das Gel auf einem Flachbettscanner zur Dokumentation eingescannt.

Tabelle 3.35: Lösungen zur Gelfärbung

Lösung	Komponente	Konzentration
Färbelösung	Methanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	7 % (v/v)
	Coomassie Brilliant-Blue R250	0,25 %
Entfärbelösung	Methanol	40 % (v/v)
	Essigsäure	7 % (v/v)

4. Ergebnisse

4.1 Die CiaRH-regulierten intergenen Promotoren

Die Bestimmung des CiaRH-Regulons bei *S. pneumoniae* stand seit der Entdeckung dieses interessanten Systems im Mittelpunkt mehrerer Untersuchungen. In drei Studien wurden Microarray basierte Transkriptomanalysen zur Auffindung der CiaRH-abhängigen Gene veröffentlicht (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Viele Gene schienen von diesem System reguliert zu sein. Welche Gene direkt oder indirekt reguliert werden, blieb ungeklärt. Zur Auffindung direkt regulierter Gene wurde ein genomweiter DNA-Bindeassay durchgeführt (Mascher *et al.*, 2003). Dabei wurden 18 DNA-Fragmente gefunden, welche eine Interaktion mit CiaR eingingen. Einige Gene, welche sich auf diesen Fragmenten befanden und von welchen folglich eine CiaRH-abhängige Regulation vermutet werden konnte, konnten unter den durch die Microarray-Analysen ermittelten CiaRH-regulierten Genen nicht wiedergefunden werden. Durch eine vergleichende Sequenz-Analyse zweier eindeutig regulierter Gene und durch die eingehende Untersuchung von gefundenen ähnlichen DNA-Motiven, konnte die Bindestelle für den Response Regulator CiaR identifiziert werden (Halfmann *et al.*, 2007). Diese befindet sich 10 bp stromaufwärts der -10 Regionen der positiv regulierten Gene und besteht aus einer Repeatsequenz von 6 bp, welche durch 5 bp voneinander getrennt vorliegen:

5'- **TTTAAG**-N5-(**T/A**)**TTAAG**-N10-**TATAAT** -3'

Abbildung 4.1: Organisation der CiaR-Bindestelle. Die Repeatsequenz, an welche der Response Regulator CiaR bindet, ist rot, die -10-Region ist blau dargestellt.

Die gesamte Genomsequenz wurde nach Promotoren, welche dieses Bindemotiv beinhalteten, durchsucht. Durch eine Analyse der gefundenen Promotoren konnte bei 16 Promotoren eindeutig eine Regulation durch das CiaRH-System nachgewiesen werden. Fünf Promotoren des neu definierten CiaRH-Regulons sind in Intergenbereichen lokalisiert. Der Nachweis und die Untersuchung der Transkripte, welche von diesen Promotor aus produziert werden, steht im Mittelpunkt des ersten Teils dieser Arbeit.

Im zweiten Teil der Arbeit sollen eventuelle Zusammenhänge zwischen den stark CiaRH-regulierten intergenen Promotoren und den hiervon ausgehenden Transkripten mit dem CiaRH-System assoziierten Phänotypen aufgedeckt werden.

4.1.1 Genetische Organisation der CiaRH-regulierten intergenen Promotoren

Die Definition des Regulons des Zwei-Komponenten Systems CiaRH ergab fünf CiaR-Bindestellen in intergenen Bereichen. Diese Fragmente wurden in das Pneumo Promotor Probe Plasmid pPP2 kloniert und auf eine Promotoraktivität getestet. In allen fünf Fällen konnte eine starke CiaR-abhängige Promotoraktivität gemessen werden. Mittels Bandshift Analyse dieser Fragmente konnte die Bindung des phosphorylierten CiaR-Regulators an diesen Sequenzen *in vitro* ebenfalls nachgewiesen werden (Halfmann *et al.*, 2007). Die intergenen Promotoren werden im Folgenden P_{IG-1} bis P_{IG-5} genannt und ihre DNA-Sequenzen sind in Abbildung 4.2 dargestellt.

P _{IG-1}	TTTTTCTTAAGCAAAATTTAAGGATGGTCTAGTATTATATAGTCATTAAA
P _{IG-2}	GAAAAGTTAAGCTAGTTTTAAGTTTCGTCTGTATCATGTAGTTATTAAA
P _{IG-3}	AGATTTTAAGATTTGTTTAAGATAGGTCGGGTATACTATAGACGGTTAC
P _{IG-4}	AAATACTTAAGGAAACTTTAAGCTAGGGAGTGTACACTAAGTTTCATAAGT
P _{IG-5}	GAAATTTTAAGTTCTATTTAAGATTAGATGTGTATACTATAATCATTAAA

Abbildung 4.2: Genetische Organisation der CiaRH-regulierten intergenen Promotoren. Die CiaR-Bindestellen sind rot, die -10-Regionen gelb und die Transkriptionsstartpunkte sind grün markiert.

Diese Promotoren schienen jedoch nicht die Promotoren der stromabwärts liegenden Gene zu sein. Dafür sprechen zum Einen die beiden in weitem Abstand zum nachfolgenden Gen hintereinander lokalisierten Promotoren P_{IG-1} und P_{IG-2}. Zum Anderen konnten unmittelbar stromaufwärts der Startcodons und Translationsinitiationssignale der nachfolgenden Gene, stark konservierte putative Promotorsequenzen durch visuelle Betrachtung der DNA-Sequenzen aufgedeckt werden.

Bei der Analyse der DNA-Sequenzen stromabwärts der intergenen Promotoren fiel zudem auf, dass in stromabwärts-Bereichen von bis zu 150 bp ähnliche Sequenzabschnitte vorhanden sind (siehe Abschnitt 4.2.2). Die Untersuchung der DNA-Struktur stromabwärts der neuen intergenen Promotoren deckte in einem Abstand von 120 bis 170 bp stem-loop Strukturen auf, welche Rho-unabhängigen Transkriptionsterminatoren ähneln. Diese Beobachtungen ließen schließlich die Vermutung aufkommen, dass diese Promotoren die Expression von kleinen, nichtkodierenden RNAs steuern könnten.

Die Lokalisation der intergenen CiaRH-abhängigen Promotoren (P_{IG-1} bis P_{IG-5}) ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Die Promotoren P_{IG-1} und P_{IG-2} sind in 155 bp Abstand zueinander in der Intergenregion zwischen den Genen spr0237 und *ruvB* lokalisiert. Zwischen spr0237 und *ruvB* befindet sich eine Intergenregion von 1039 bp. Der P_{IG-1} Promotor beginnt bereits 15 bp stromabwärts des spr0237-Gens.

Zwischen P_{IG-2} und dem annotierten Startcodon des *ruvB*-Gens ist eine freie Region von 800 bp vorhanden.

Der P_{IG-3} Promotor befindet sich in einer 199 bp Intergenregion zwischen *purA* und *spr0022*. Der Promotor beginnt 6 bp nach dem Stopcodon des *purA*-Gens. In einem Abstand von 160 bp ist das Startcodon für *spr0022* annotiert.

Der P_{IG-4} Promotor befindet sich zwischen den Genen *spr0239* und *uppS* in einer 211 bp großen Intergenregion. Der Promotor überlappt um 5 bp mit *spr0239*. 184 bp stromabwärts ist *uppS* annotiert.

Der P_{IG-5} Promotor befindet sich zwischen den Genen *spr0218* und *gpmB*. Die Intergenregion erstreckt sich hier über 242 bp. 15 bp stromabwärts von *spr0218* beginnt der Bereich von P_{IG-5} . 138 bp stromabwärts befindet sich das annotierte Startcodon des *gpmB*-Gens.

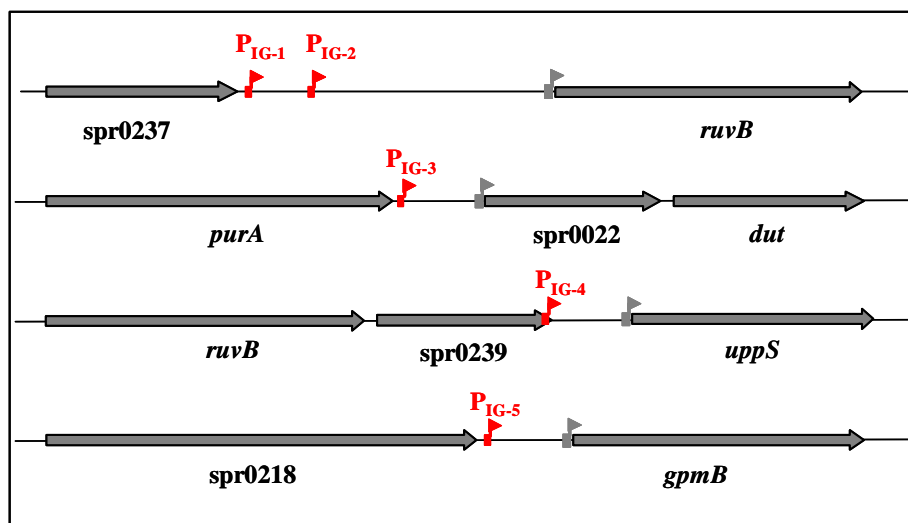


Abbildung 4.3: Genetische Organisation der CiaRH-regulierten intergenen Promotoren. Eine jeweils 2,5 kb Region um die CiaRH-regulierten intergenen Promotoren ist dargestellt. Die CiaRH-regulierten Promotoren P_{IG-1} bis P_{IG-5} sind mit roten Fahnen symbolisiert und beschriftet. Die putativen Promotoren der stromabwärts liegenden Gene sind mit grauen Fahnen dargestellt.

4.1.2 Detektion der von den intergenen CiaRH-regulierten Promotoren ausgehenden Transkripte mittels Northern Blot-Analyse

Mittels Northern Blot-Analyse sollten die von den CiaRH-regulierten intergenen Promotoren ausgehenden Transkripte detektiert und ihre Größe bestimmt werden.

Hierzu wurde jeweils 3 μ g Gesamt-RNA in einem 8% denaturierenden Polyacrylamid-Gel mit 6,4 M Harnstoff aufgetrennt. Dieses Gel trennt RNAs, welche weniger als 500 Basen besitzen, ihrer Größe nach auf. Größere RNA-Moleküle können nicht in das Gel hineinwandern und verbleiben in den Taschen. Für die Hybridisierung wurden Sonden für alle fünf putativen Transkripte eingesetzt. Diese Sonden besaßen eine Größe von 48 Basen, und waren an ihren 5'-Enden mit Digoxigenin (DIG) markiert. Als Anhaltspunkt für das Sondendesign dienten die bekannten Transkriptionsstartpunkte.

Die Sonden wurden revers-komplementär, mit dem jeweiligen +1 endend, gelegt. Die Visualisierung erfolgte durch eine Farbreaktion, hervorgerufen durch die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase (Abschnitt 3.3.11). Der verwendete Marker wurde selbst hergestellt. Dies war nötig, da für Fragmente kleiner als 300 Basen keine kommerziellen DIG-markierten Marker erhältlich sind. Es wurden RNA-Fragmente der Größen 70, 100, 150 und 200 Basen *in vitro* mit der T7 RNA-Polymerase produziert und gemischt. Die Detektion der Markerbanden erfolgte durch Zugabe einer DIG-markierten Sonde, welche komplementär zum 5'-Ende aller Marker-RNA Fragmente war (Abschnitt 3.3.13).

Aus Kulturen in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase vom Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* mit inaktiviertem CiaR wurde Gesamt-RNA präpariert. Im Fall des Wildtypstamms R6 konnten mehrere starke Banden detektiert werden (Abbildung 4.4). Der Laufabstand der Markerbanden (cm) wurde gegen den dekadischen Logarithmus ihrer Größe halblogarithmisch aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt. Mithilfe dieser Geraden wurde die Größe der RNA-Banden ermittelt. Für die oberste RNA-Bande konnte eine Größe von 141 Basen ermittelt werden. Die anderen vier Banden befinden sich in unmittelbarer Nähe zueinander. Für diese konnten Größen von 93, 91, 89 und 87 Basen ermittelt werden. Die Banden bei 93, 91 und 87 besitzen annähernd die gleiche Intensität, wogegen die Bande mit 89 Basen ein schwächeres Signal liefert.

Die CiaRH-abhängige Expression konnte ebenfalls bestätigt werden. In der Spur mit der RNA des Stammes ohne intaktes CiaR konnte nur ein sehr schwaches Signal auf der Höhe von 93 Basen detektiert werden.

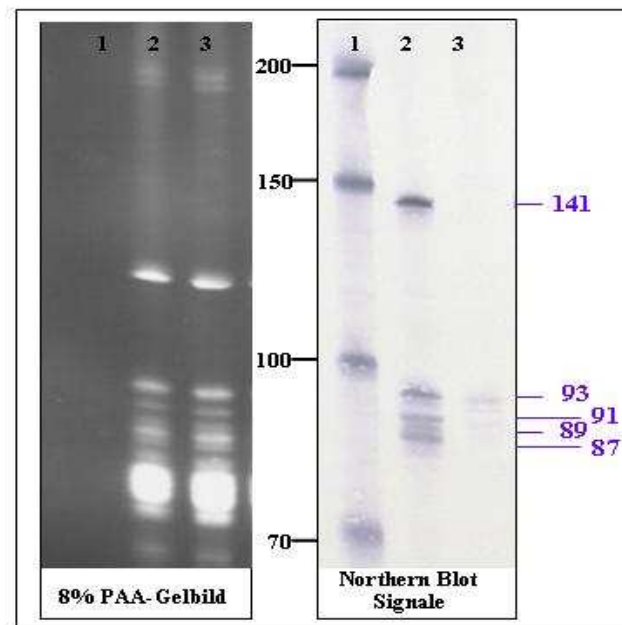


Abbildung 4.4: Northern-Analyse der kleinen RNAs nach Auftrennung in einem 8% PAA-Gel mit 6,4 M Harnstoff. Das Ethidium-Bromid gefärbte Gel und ein Abbild der Northern Blot Membran ist dargestellt. Jeweils 3 µg Gesamt-RNA und 1 µl Marker wurde aufgetrennt. Es wurden Sonden (10 pM/ml) für alle fünf csRNAs und für die RNA-Marker verwendet. In Spur 1 sind die Markerbanden zu sehen. In Spur 2 ist Gesamt-RNA des Wildtypstammes *S. pneumoniae* R6 aufgetragen. In Spur 3 befindet sich RNA aus *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9*. Die Größe der RNAs wurde berechnet und lila dargestellt.

Durch diesen Blot konnte die Annahme, dass von den CiaRH-regulierten intergenen Promotoren aus kleine RNAs transkribiert werden, eindeutig bestätigt werden. Gleichzeitig ist erkennbar, dass diese CiaRH-abhängigen kleinen RNAs in den Zellen von *S. pneumoniae* R6 in gut detektierbaren Mengen vorhanden sind.

Die neu identifizierten kleinen RNAs wurden als csRNA1, csRNA2, csRNA3, csRNA4 und csRNA5 bezeichnet. csRNA steht hierbei für *c*ia controlled *s*mall *R*NA. csRNA1 wird vom CiaRH-abhängigen Promotor P_{IG-1} aus transkribiert, csRNA2 von P_{IG-2}, csRNA3 von P_{IG-3}, csRNA4 von P_{IG-4} und csRNA5 ausgehend von P_{IG-5}.

Durch weitere Northern Blot-Analysen sollte geklärt werden, ob auch längere RNA-Transkripte ausgehend von diesen Promotoren detektierbar sind. Hierfür wurde 10 µg Gesamt-RNA aus den beiden Stämmen in einem 2% denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt. In diesem Gel wird im Gegensatz zu hochprozentigen PAA-Gelen die gesamte RNA aufgetrennt und kann geblottet werden. Die Detektion erfolgte wie oben bereits beschrieben. Auch hier wurden Sonden für alle csRNAs eingesetzt. Im Fall des Wildtypstamms R6 konnte direkt oberhalb der tRNAs ein starkes Signal detektiert werden (Abbildung 4.5). Die RNA des Stammes mit inaktivem CiaR zeigt auf dieser Höhe keine Signale. Auf der Höhe der tRNAs ist bei R6 ein zusätzliches Signal zu sehen, welches im Stamm mit inaktivem CiaR in der Nachbarspur viel schwächer ausgeprägt ist. Bei diesen beiden Signalen handelt es sich höchstwahrscheinlich um die csRNAs. Die obere Bande, welche in Abwesenheit von CiaR vollkommen verschwindet, könnte die csRNA mit der Länge von 141 Basen darstellen. Die untere Bande beinhaltet möglicherweise die anderen vier csRNAs mit den Längen zwischen 87 und 93 Basen. In der Spur mit der RNA des R6 *ciaR::aad9* ist hier nur ein schwaches Signal erkennbar.

Oberhalb dieser Signale können weitere Banden gesichtet werden. Die stärkste dieser Banden befindet sich auf der Höhe der 16S-rRNA. Diese erscheint in beiden Spuren etwa gleich stark und kann auf eine unspezifische Hybridisierung der Sonden mit der sehr hoch konzentrierten ribosomalen RNA zurückgeführt werden. Außer diesen möglichen rRNA-Banden ist eine Hintergrundfärbung mit mehreren, eher schwachen Banden zu sehen. Diese Banden sind auch in beiden Spuren sichtbar und scheinen daher unspezifisch zu sein.

Durch die Untersuchung der Gesamt-RNA mittels Northern Blot konnten keine CiaRH-abhängigen langen Transkripte mit den eingesetzten Sonden detektiert werden. Es konnten zwei spezifische Signale identifiziert werden, welche durch die Anwesenheit der csRNAs hervorgerufen werden. Spätere Northern Blot-Analysen mit Gesamt-RNAs aus Stämmen, welche nur bestimmte csRNAs exprimieren, bestätigten die Annahme, dass es sich bei der oberen spezifischen Bande um die lange csRNA5 handelt und die unteren Banden die vier anderen csRNAs1-4 beinhalten.

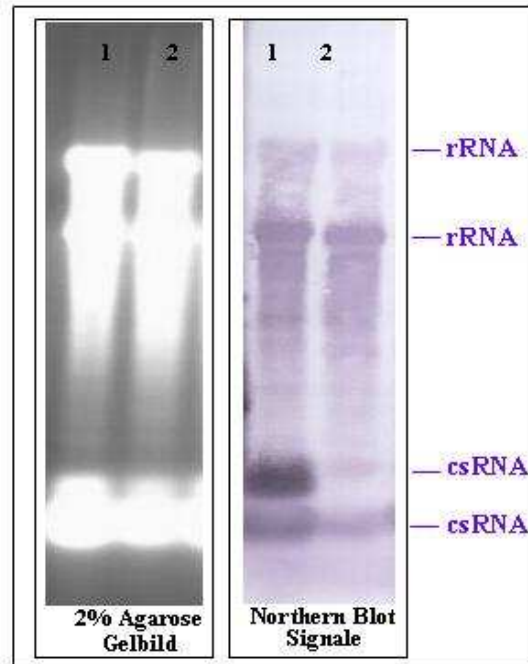


Abbildung 4.5: Northern-Analyse der csRNAs nach Auftrennung in einem 2% denaturierenden Agarose-Gel. Das Ethidium-Bromid gefärbte Gel und ein Abbild der Northern Blot Membran ist dargestellt. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurde aufgetrennt. Es wurden Sonden (10 pM/ml) für alle fünf csRNAs verwendet. In Spur 1 ist Gesamt-RNA des Wildtypstammes *S. pneumoniae* R6 aufgetragen. In Spur 2 befindet sich RNA aus *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9*.

4.1.3 Detektion der csRNAs mittels Northern Blot-Analyse in RNA-Isolaten aus verschiedenen Wachstumsphasen

Die Aktivität der Promotoren der csRNAs wurde bereits in verschiedenen Wachstumsphasen vermessen (Halfmann, Doktorarbeit 2008). Während des gesamten Wachstums konnten hierbei starke Promotoraktivitäten beobachtet werden. Durch Northern Blot-Experimente sollte untersucht werden, ob die csRNAs in den Zellen tatsächlich während des ganzen Wachstums vorhanden sind.

Dafür wurde Gesamt-RNA aus *S. pneumoniae* R6 bei vier verschiedenen Zeitpunkten isoliert. In der frühen exponentiellen Phase bei Nephelo 20, in der mittleren exponentiellen Phase bei Nephelo 60, in der spätexponentiellen Phase bei Nephelo 100 und in der spätstationären Phase 2 Stunden nach Eintritt in die stationäre Phase. Jeweils 3 µg RNA wurde mittels einem 6% denaturierenden PAA-Gel in einem Mini-PROTEAN® 3 Cell System aufgetrennt. Diese Apparatur bietet eine einfache Arbeitsweise und schnelle Auftrennung. Bei den hier verwendeten kurzen Gelen ist ein 6%-Gel besser als eine 8%-Gel für die Auftrennung von Gesamt-RNA geeignet. Die Detektion erfolgte wie bereits zuvor beschrieben mit Sonden für alle fünf csRNAs. Abbildung 4.6 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

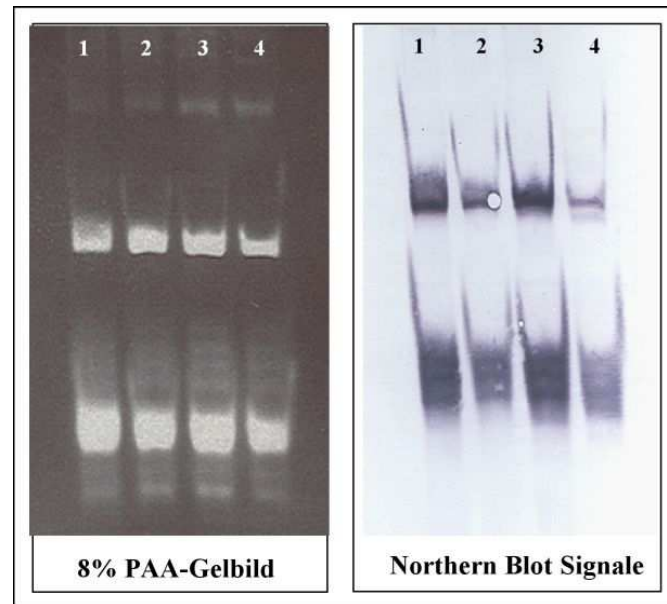


Abbildung 4.6: Northern-Analyse der csRNAs nach Auftrennung in einem 6% PAA-Gel in vier verschiedenen Wachstumsphasen. Das Ethidium-Bromid gefärbte Gel und ein Abbild der Northern Blot Membran ist dargestellt. Jeweils 3 µg Gesamt-RNA wurde aufgetrennt. Es wurden Sonden (10 pM/ml) für alle fünf csRNAs verwendet. In der ersten Spur befindet sich RNA aus der frühen exponentiellen Phase bei Nephelo 20, in der zweiten Spur RNA aus der mittleren exponentiellen Phase bei Nephelo 60, in der dritten Spur RNA aus der spätexponentiellen Phase bei Nephelo 100 und in der letzten Spur RNA 2 Stunden nach Eintritt in die spätstationäre Phase.

Bei allen diesen vier Zeitpunkten konnten starke csRNA-Signale detektiert werden. Die Signalstärke wies jedoch Unterschiede auf. In der mittleren exponentiellen Phase sowie spätstationär sind die Signale schwächer, was auf eine geringere Menge csRNA in diesen Wachstumsphasen hindeutet. Diese Ergebnisse stehen auch im Einklang mit den gemessenen Promotoraktivitäten während des Wachstums (Halfmann, Doktorarbeit 2008).

4.1.4 Bestimmung der 3'-Enden der csRNAs mittels 3'-RACE-Analyse

Die Länge der csRNAs konnte anhand der Northern Blot-Analyse in etwa bestimmt werden. Durch bioinformatische Untersuchung ihrer Sequenzen konnten Terminatorstrukturen an den 3'-Enden der csRNAs identifiziert werden. Anhand dieser Daten sind csRNA1 bis csRNA4 zwischen 87 und 100 Basen lang. Die bioinformatische Analyse der csRNA5 ergab eine Länge von ca. 147 Basen. Die größte RNA bei der Northern Analyse lag bei 141 Basen, womit davon auszugehen war, dass es sich hierbei um die csRNA5 handelt.

Mittels 3'-RACE-Analysen (Abschnitt 3.3.10) sollte die Länge aller fünf csRNAs auf die Base genau bestimmt werden. Hierbei wird ein RNA-Oligo mit bekannter Sequenz an das 3'-Ende der mRNAs ligiert. Das Oligo muss dementsprechend an seinem 5'-Ende phosphoryliert vorliegen, damit die RNA-Ligase die Reaktion durchführen kann. Anschließend wird eine reverse Transkription unter

Verwendung eines oligospezifischen Primers durchgeführt. Dementsprechend werden alle RNAs, welche ein ligiertes Oligo am 3'-Ende tragen, in cDNA revers-transkribiert. Diese cDNA wird anschließend mit einem genspezifischen und einem oligospezifischen Primer amplifiziert. Der genspezifische Primer wird dabei an das 5'-Ende des zu untersuchenden Transkripts positioniert. Die 5'-Enden der csRNAs zeigen jedoch eine hohe Ähnlichkeit (Abbildung 4.14). Im Fall der csRNA1 und csRNA2 sind die ersten 47 Basen zudem identisch und weitere Bereiche stromabwärts zeigen ebenfalls eine hohe Homologie. Da bedingt durch diese Homologien Kreuzreaktionen der Primer nicht auszuschließen waren, konnten keine genspezifischen Primer gelegt werden und die 3'-RACE-Analyse konnte nicht unter Verwendung von Gesamt-RNA des Wildtyps R6 erfolgen. Für die Analyse wurden csRNA-Inaktivierungsstämme verwendet, welche jeweils nur die zu untersuchende csRNA exprimierten. Die Konstruktion dieser Stämme wird in Abschnitt 4.4 beschrieben.

Am Beispiel von csRNA3 soll die Methode erläutert werden. Das RNA-Oligo 3'RACE_Adapter war an seinem 5'-Ende phosphoryliert. Somit konnte die Ligation am 3'-Ende der csRNA3 mittels T4 RNA-Ligase (Biolabs) erfolgen. Die reverse Transkription erfolgte mit dem Primer RACE_PCR_5, welcher reverse-komplementär zu den letzten 18 bp des ligierten Oligos ist.

```

RNA3_RACE_5 >
GGUUAACAAGA AGACCUCCUA ACUUGUUGUA ACAAAUAUCC UAAACUUUUC UUUUUCAUAA
>>.....csRNA3.....>

UAAUCUCCCU AUAGAGUCAC CGCAUUCGGT GGCUUUUUUU UUUCUUCUAG UGUUCGUUCU
>.....csRNA3.....>> >..3`RACE_Adapter...<

< RACE_PCR_5
ACAGGAAUUC GCGCAUUC
>..3`RACE-Adapter..<

```

Abbildung 4.7: Die Methode der 3'-RACE-Analyse am Beispiel von csRNA3. Die Ligation des Oligos 3'RACE_Adapter (Sequenz rot dargestellt) erfolgte an das 3'-Ende von csRNA3. Die reverse Transkription der so erhaltenen RNA erfolgte mit dem Primer RACE_PCR_5 (komplementäre Region blau unterlegt). Die Amplifikation des cDNA-Fragments wurde mit den Primern RACE_PCR_5 (komplementäre Region blau unterlegt) und RNA3_RACE_5 (komplementäre Region gelb unterlegt) durchgeführt.

Für die Amplifikation der cDNA mittels PCR wurde der gleiche oligospezifische Primer (RACE_PCR_5) sowie der genspezifische Primer RNA3_RACE_5 verwendet. Im Falle von csRNA3 sollte ein Fragment von etwa 138 bp entstehen. Dieses Fragment wurde aufgereinigt, phosphoryliert und in *Sma*I-verdauten und dephosphorylierten pUC19 ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 α transformiert und auf Ampicillin und X-Gal selektioniert. Im Fall der klonierten cDNA von csRNA3 wurden die Plasmide aus 12 weißen bzw. hellblauen Kolonien präpariert und mittels *Eco*RI- und *Bam*HI-Verdau analysiert. Bei 8 Plasmiden konnte ein Fragment der erwarteten Größe und bei einem Plasmid ein Fragment mit der doppelten Insertgröße herausgeschnitten werden. Die anderen drei Plasmide besaßen kleinere Inserts. Die Inserts aller 12 Plasmide wurden sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass ein Plasmid tatsächlich zwei aneinanderligierte csRNA3 cDNA-Fragmente besaß. Diese wurden in den weiteren Analysen mit einbezogen. Drei Plasmide mit den kleineren Inserts besaßen in ihren Klonierungsstellen jeweils einen Primer, der zu Amplifikation der cDNA verwendet wurde. Die Sequenzierung der 10 klonierten csRNA3-cDNAs ergab achtmal eine csRNA3-Länge von 100 Basen, einmal 101 und einmal 98 Basen.

Bei csRNA1 mussten 27 weiße bzw. hellblaue Klone überprüft werden um 10 csRNA1 cDNA-Inserts sequenzieren zu können. Hierbei wurde neunmal die Länge von 92 Basen und einmal eine csRNA1-Länge von 93 Basen gefunden. Bei csRNA2 musste ebenfalls eine relativ hohe Anzahl von 28 weißen bis hellblauen Klonen überprüft werden. Die dominierende Länge von csRNA2 lag bei 97 Basen. Diese Länge konnte achtmal identifiziert werden. Zudem konnten einmal 96 und einmal 98 Basen beobachtet werden. Die anderen Klone besaßen Plasmide, in welche nur Primer- oder Oligo-Fragmente ligiert waren. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei der Amplifikation der cDNA von csRNA1 und csRNA2 keine ausreichende Amplifikation des Templates erreicht werden konnte, wodurch das Verhältnis der PCR-Produkte zu übriggebliebenen Primern und unligierten Oligofragmenten niedriger war als bei den anderen Klonierungen.

Bei csRNA4 wurden 15 weiße Klone untersucht, wodurch 7 verschiedene Längen detektiert werden konnten. Es konnte keine dominierende Länge gefunden werden. Je 3 mal konnten die Längen 94 und 91 gefunden werden. Die weiteren Längen variierten zwischen 87 und 95 Basen.

Bei csRNA5 wurden 12 Klone untersucht und 4 Längen identifiziert, wobei die Länge 148 Basen überwog. Die Ergebnisse der 3'-RACE-Untersuchung aller csRNAs ist in der Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: 3'-Enden der csRNAs: Die Sequenz, die Länge und die Häufigkeit dieser Längen unter je 10 untersuchten Klonen sind dargestellt.

csRNA	Sequenz	Länge (Basen)	Häufigkeit
csRNA1	ATTAAATAAAA-70 bp-AGGTGGCTTTTT	92	9x
	ATTAAATAAAA-70 bp-AGGTGGCTTTTTT	93	1x
csRNA2	ATTAAATAAAA-70 bp-ATCAGGTGGAGTTTTT	97	8x
	ATTAAATAAAA-70 bp-ATCAGGTGGAGTTTTT	96	1x
	ATTAAATAAAA-70 bp-ATCAGGTGGAGTTTTTA	98	1x
csRNA3	GTTACAAGAA-70 bp-CCGCATTCGGTGGCTTTTTT	100	8x
	GTTACAAGAA-70 bp-CCGCATTCGGTGGCTTTTTTT	101	1x
	GTTACAAGAA-70 bp-CCGCATTCGGTGGCTTTT	98	1x
csRNA4	ATAAGTTAAG-70 bp-GCGGCTTATTTTTTT	95	1x
	ATAAGTTAAG-70 bp-GCGGCTTATTTTTT	94	3x
	ATAAGTTAAG-70 bp-GCGGCTTATTTTT	93	1x
	ATAAGTTAAG-70 bp-GCGGCTTATTTT	92	1x
	ATAAGTTAAG-70 bp-GCGGCTTATTT	91	1x
	ATAAGTTAAG-70 bp-GCGGCTTATT	90	3x
	ATAAGTTAAG-70 bp-GCGGCTT	87	1x
csRNA5	ATTAAATAAAA-120 bp-GTATGGGTGGCTTTTATTTTA	151	1x
	ATTAAATAAAA-120 bp-GTATGGGTGGCTTTTATTT	149	2x
	ATTAAATAAAA-120 bp-GTATGGGTGGCTTTTATT	148	6x
	ATTAAATAAAA-120 bp-GTATGGGTGGCTTTTAT	147	1x

4.1.5 Lokalisation und Ausdehnung der csRNA-Gene im Genom von *S. pneumoniae* R6

Aufgrund der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen 3'-RACE-Analysen und den bereits bekannten Transkriptionstartpunkten können die Gene für die fünf csRNAs im Genom von *S. pneumoniae* R6 exakt definiert werden. Im Bereich dieser Gene existieren keine offenen Leseraster, es ist also davon auszugehen, dass es sich, wie vermutet, um Gene für kleine nichtkodierende RNAs handelt. Die Genprodukte der fünf CiaRH-regulierten RNA-Gene wurden, wie bereits in Abschnitt 4.1.2 beschrieben, als csRNA (cia controlled small RNAs) bezeichnet. Die nunmehr durch die weiteren Analysen definierten, für die csRNAs kodierenden Gene, wurden als cia controlled noncoding RNAs *ccnA*, *ccnB*, *ccnC*, *ccnD* und *ccnE* bezeichnet. Dabei kodiert *ccnA* für csRNA1, *ccnB* für csRNA2, *ccnC* für csRNA3, *ccnD* für csRNA4 und *ccnE* für csRNA5. Die genaue Ausdehnung und Position der Gene im Genom von R6 ist in Abbildung 4.8 dargestellt. Annotiert wurden hierbei die aufgrund der 3'-RACE-Analysen längsten möglichen Gene der jeweiligen csRNA.

Nukleotidsequenz von *ccnA* und *ccnB*

```

231061
ATGACTTGGA TGAATCGTAA AAAATAACAA AACTTGTTTT TTCTTAAGCA AAACTTAAGG
>.....'spr0237.....>>

ATGGTCTAGT ATTATATAGT CATTAAATAA AGACCTCCTA ACTTTATTTA ATAAAATCCT
>>.....ccnA.....>

AAACTTTTTT CATCACAATC TCCTAATGAA GCCACCCAAT CAGGTGGCTT TTTTGCCTGG
>.....ccnA.....>>

TGAGGTGCTG GTGATAGAAA TTTTGTGCAA AATAGTAAAA TTTTAGAAAA GTTAAGCTAG
TTTAAGTTT CGTCTTG TAT CATGTAGTTA TTAAATAAAG ACCTCCTAAC TTTATTTAAT
>>.....ccnB.....>

AAAATCCTAA ACTTTTCTTT TTCATAATAA TCTCCCTTAA CTCCACCCAA TCAGGTGGAG
>.....ccnB.....>
231480
TTTTTTAGCT CTATTCAGG CTTTGGGGA CTATTCTAAA AATAATTTT CGATATTTT
>....>>

```

Nukleotidsequenz von *ccnC*

```

23862
ACTTTCTCAG TAGGTCCTGG TCGTGAACAA ACAAATATTT TAGAAAGTGT TTGGTCCTAA
>.....'purA.....>>

GAGATT TTA AGATTG TTT AAGATAGGTC GGT TACTA TAGAC GTTA CAAGAAGACC
>>....ccnC.....>

TCCTAACTTG TTGTAACAAA TATCCTAAAC TTTTCTTTT CATAATAATC TCCCTATAGA
>.....ccnC.....>
24101
GTCACCGCAT TCGGTGGCTT TTTTGTGTT GGGATTCATG ATATAATAAT AAAATCGATA
>.....ccnC.....>>

```

Nukleotidsequenz von *ccnD*

```

233610
CTATCAAACA CGTTTATCCA AGAAAAATTG GCAGGAGAAA TGGAAAAATT TGATTTTAA
>.....'spr0239.....>>

AAATACTTAA GGAACTTTA AGCTAGGGAG GT TACTA GTTC TAAGT TAAGAAGACC
>.....>> >>....ccnD.....>

TTAACTTAAA CTCCTAAAAC TTTTTCATAA TAATCTCCCT ATAAAAATAA AGTCGCCCAA
>.....ccnD.....>
233849
TCAGGCGGCT TATTTTTTTG AAAAATGGGC TTGGTGCCTG AGAATAAATA GCTTAGTGAT
>.....ccnD.....>>

```

Nukleotidsequenz von *ccnE*

```

212201
AATTCATAGT TTTAAAAATT AAGAAAATAG GAGAAATTTT AAGTTCTATT TAAGATTAGA
>.....'spr0218.....>>

TGTGTATACT ATAATCATT AATAAAGACC TCCTAATATT ATTTGAAACA GATAACACTG
>>.....ccnE.....>

AATTAGTTTG AATTGATTT TCATCTAATA TCTTTATTTA ATGAACTCCT AAACTTTTTC
>.....ccnE.....>
212440
ATAATAATCT CCTTCAAAAG TCGCCTGTAT GGGTGGCTTT TATTTTATCA TTCATGATAT
>.....ccnE.....>>

```

Abbildung 4.8: Nukleotidsequenzen der *ccn*-Gene. Die CiaR-boxen sind rot und die zugehörigen -10-Regionen sind gelb unterlegt. Grün markiert sind die mittels 5'-RACE-Analyse bestimmten +1 der *ccn*-Gene. Die Zahlen am Anfang und am Ende der Sequenzen zeigen die Lokalisation des Fragments im Genom von *S. pneumoniae* R6.

4.2 Bioinformatische Analyse der csRNAs

Es wurde mehrfach gezeigt, dass die sekundäre Faltstruktur von kleinen nichtkodierenden RNAs einen erheblichen Einfluss auf ihre Funktion und Stabilität *in vivo* hat. Um die Sekundärstruktur der csRNAs bestimmen zu können, bzw. um eventuell vorhandene bekannte Sequenzmotive aufzudecken, wurden die Sequenzen der csRNAs mittels bioinformatischen Analysen untersucht. Für die Bestimmung der energetisch günstigsten Faltstruktur der csRNAs wurde das mfold-Programm benutzt (Zuker, 2003). Dieses Programm ist unter <http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu/twostate.php> frei verfügbar. Bei allen fünf csRNAs konnten ähnliche Faltstrukturen erstellt werden. Alle besitzen eine ungepaarte Region von 33 bis 40 Basen, welche an beiden Enden von je einem Stem-Loop begrenzt wird. Zudem konnten interessante Sequenzmotive identifiziert werden.

4.2.1 Darstellung der csRNA-Faltstrukturen

Bei csRNA1 konnten die Längen 92 und 93 Basen bestimmt werden. Der größte Anteil an csRNA1 besaß jedoch eine Länge von 93 Basen. Der erste Stamm besteht aus 11 komplementären Basenpaarungen: Zehn A-U Paare sowie ein terminales G-C Paar. Im Loop dieses Stammes befindet sich eine anti-Shine-Dalgarno-Sequenz (CCUCCU) (Shine und Dalgarno, 1974). Die mittlere ungepaarte Region ist 35 Basen lang und beinhaltet ebenfalls eine mögliche anti-SD-Sequenz und zudem in einem Abstand von 6 Basen ein anti-AUG (CAU-N6-CUCCU). Diese Region könnte an die Translationsinitiationsregion von mRNAs binden. Der Terminatorstamm besteht aus neun

komplementären Basenpaarungen. Die Transkriptionstermination erfolgt am zweiten bzw. dritten U nach dem vorhergesagten Terminatorstamm.



Abbildung 4.9: Die csRNA1-Faltstruktur. Die Faltstruktur wurde mit dem mfold-RNA-Faltprogramm hergestellt. Die anti-Shine-Dalgarno- und anti-AUG Sequenzen wurden rot dargestellt. Die Sterne symbolisieren die mittels 3'-RACE-Analyse bestimmten Enden. Mit zwei Sternen ist das am häufigsten gefundene Ende markiert.

Bei csRNA2 konnten die Längen 96, 97 und 98 Basen bestimmt werden. Der größte Anteil an csRNA2 besaß eine Länge von 97 Basen. Der erste Stamm besteht in Analogie zu csRNA1 erneut aus 11 komplementären Basenpaarungen: Zehn A-U Paare und ein terminales G-C Paar. Im Loop dieses Stammes befindet sich ebenfalls eine anti-SD-Sequenz (CCUCCU). Die mittlere ungepaarte Region ist 38 Basen lang und beinhaltet ebenfalls die oben erwähnten anti-SD- und anti-AUG Sequenzen. Der Terminatorstamm besteht auch hier aus neun komplementären Basenpaarungen. Die Transkriptionstermination erfolgt am dritten und vierten U, beziehungsweise am darauffolgenden A nach dem vorhergesagten Terminatorstamm.



Abbildung 4.10: Die csRNA2-Faltstruktur. Die Faltstruktur wurde mit dem mfold-RNA-Faltprogramm hergestellt. Die anti-Shine-Dalgarno- und anti-AUG-Sequenzen wurden rot dargestellt. Die Sterne symbolisieren die mittels 3'-RACE-Analyse bestimmten Enden. Mit zwei Sternen ist das am häufigsten gefundene Ende markiert.

Bei csRNA3 konnten die Längen 98, 100 und 101 Basen bestimmt werden. Der größte Anteil an csRNA3 besaß eine Länge von 100 Basen. Der erste Stamm besteht aus 10 komplementären Basenpaarungen: Sieben A-U Paare und drei G-C Paare, wobei der Stem auch hier mit einem G-C-

Paar abgeschlossen wird. Die Komplementarität wird in diesem Stamm durch zwei gegenüber lokalisierte Guanin-Reste unterbrochen. Im Loop dieses Stammes ist die anti-SD-Sequenz (CCUCCU) ebenfalls zu finden. Die mittlere ungepaarte Region ist 40 Basen lang und beinhaltet mit einer Base Abweichung ebenfalls die oben erwähnten anti-SD und anti-AUG Sequenzen CAU-N6-CUCCCU. Der Terminatorstamm besteht aus zehn komplementären Basenpaarungen. Die Transkriptionstermination erfolgt am ersten, dritten und vierten U nach dem vorhergesagten Terminatorstamm.

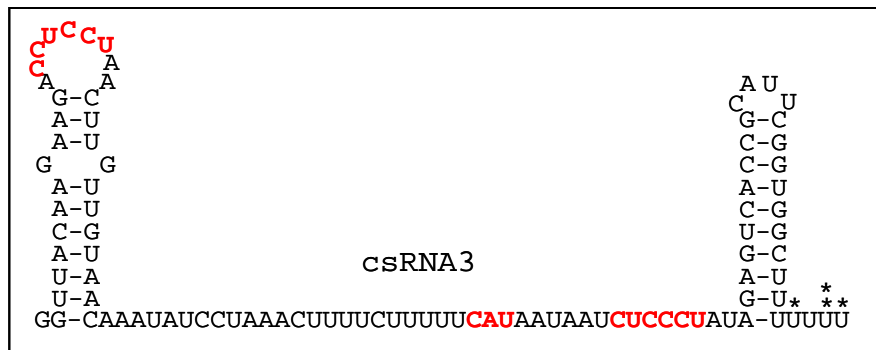


Abbildung 4.11: Die csRNA3-Faltstruktur. Die Faltstruktur wurde mit dem mfold-RNA-Faltprogramm hergestellt. Die anti-Shine-Dalgarno- und anti-AUG-Sequenzen wurden rot dargestellt. Die Sterne symbolisieren die mittels 3'-RACE-Analyse bestimmten Enden. Mit zwei Sternen ist das am häufigsten gefundene Ende markiert.

Bei csRNA4 konnten sieben verschiedene Längen detektiert werden. Dabei handelte es sich um Längen zwischen 87 und 95 Basen. Eine dominierende Länge für csRNA4 konnte nicht gefunden werden. Die Längen von 91 und 94 Basen wurden jeweils dreimal identifiziert. Die anderen Längen kamen jeweils einmal vor. Der erste Stamm besteht aus 9 komplementären Basenpaarungen: Sieben A-U Paare und zwei G-C Paare. Der Loop dieses Stammes besteht aus nur 5 Basen und ihm fehlt zudem eine anti-SD-Sequenz. Der erste Stamm wird auch hier durch ein G-C-Paar geschlossen. Die mittlere ungepaarte Region ist 34 Basen lang und beinhaltet, wie auch die csRNA3 die CAU-N6-CUCCCU Sequenz und zusätzlich eine weitere anti-SD-Sequenz. Der Terminatorstamm besteht aus 14 komplementären Basenpaarungen. Der Abbruch der Transkription beginnt jedoch im Terminator nach den ersten sechs komplementären Basenpaarungen. Hier befindet sich ein zusätzlich eingeschobenes Adenosin, welches kein komplementäres U auf der andere Seite des Stammes hat. Die Termination kann bereits nach den ersten 6 Basenpaaren erfolgen, woraus eine csRNA4 resultiert, welche 87 Basen lang ist. Die ersten sechs Basenpaarungen im Terminatorstamm sind GC-reich, die restlichen Basenpaarungen bestehen aus A-U Paaren, welche energetisch schwächer als die G-C Paare sind.



Abbildung 4.12: Die csRNA4-Faltstruktur. Die Faltstruktur wurde mit dem mfold-RNA-Faltprogramm hergestellt. Die anti-Shine-Dalgarno- und anti-AUG-Sequenzen wurden rot dargestellt. Die Sterne symbolisieren die mittels 3'-RACE-Analyse bestimmten Enden. Mit zwei Sternen sind die am häufigsten gefundenen Enden markiert.

Der größte csRNA ist csRNA5. Für sie wurden die Längen 147, 148, 149 und 151 Basen bestimmt. Der größte Anteil an csRNA5 besaß eine Länge von 148 Basen. Bei dieser csRNA konnten, im Gegensatz zu allen anderen, zwei alternative Faltstrukturen hergestellt werden. Die Grundstrukturen unterscheiden sich allerdings nicht wesentlich und energetisch sind sie zudem sehr ähnlich. Der erste Stamm besteht bei beiden Faltungen aus 86 Basen und bildet eine lange Stammstruktur. Zwischen einzelnen komplementären Abschnitten befinden sich immer wieder Auswölbungen mit nicht komplementären Basen bzw. Baseneinschübe. Der Anfangsbereich des Stammes besteht in beiden Faltungen aus den gleichen 12 komplementären Basen. Die Zusammensetzung der Paare ist ähnlich wie bei csRNA1, csRNA2 und csRNA3: Elf A-U Paare und ein G-C Paar. Nach diesem „Grundstamm“ folgt eine seitliche Auswölbung, welche die CCUCCU anti-SD-Sequenz beinhaltet. Oberhalb des „Grundstammes“ befinden sich neben nicht paarenden Bereichen auch viele A-U Paare. Die Variabilität in beiden Faltmodellen ist ausschließlich in diesem Bereich lokalisiert. Die mittlere ungepaarte Region ist 33 Basen lang und beinhaltet erneut die Sequenz UCCUC-N6-UAC, welche auch bei csRNA1 zu finden war. Der Terminatorstamm besteht aus elf komplementären Basenpaarungen. Die Transkriptionstermination erfolgt am dritten, vierten und fünften U, sowie am dem vorhergesagten Terminatorstamm nachfolgenden A.

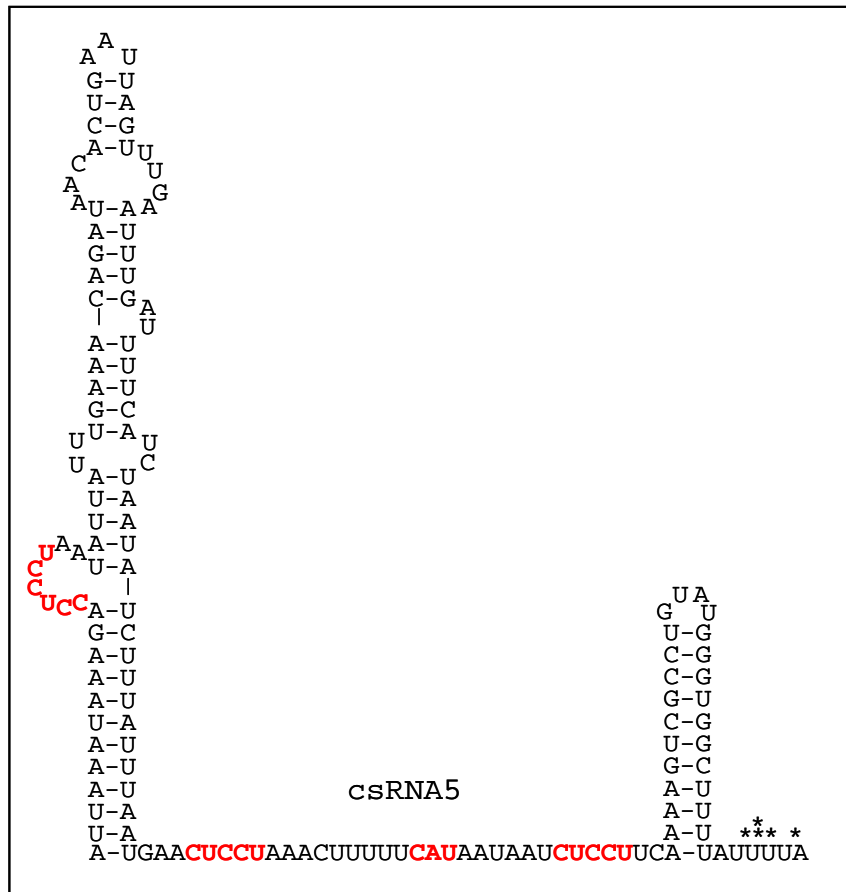


Abbildung 4.13: Die csRNA5-Faltstruktur. Die Faltstruktur wurde mit dem mfold-RNA-Faltprogramm hergestellt. Die anti-Shine-Dalgarno- und anti-AUG-Sequenzen wurden rot dargestellt. Die Sterne symbolisieren die mittels 3'-RACE-Analyse bestimmten Enden. Mit zwei Sternen ist das am häufigsten gefundene Ende markiert.

4.2.2 Sequenzvergleich der csRNAs

Die einzelnen csRNAs weisen viele zueinander ähnliche Bereiche auf. Durch den Sequenzvergleich konnte gezeigt werden, dass der csRNA5-„Grundstamm“ starke Ähnlichkeit zu den anderen csRNA-Stämmen hat. Eine Sequenz-Insertion von mehr als 50 Basen befindet sich zwischen den beiden Armen des „Grundstammes“.

Die ersten Stämme zeigen jeweils bei allen csRNAs zwei ähnliche Blöcke, welche eigentlich nur durch eine unterschiedliche Base getrennt werden. Bei csRNA4 fehlt die CCUCCU anti-SD-Sequenz im Loop. Die mittlere Region der csRNAs ist ebenfalls durch ähnliche Sequenzen geprägt. Mehrere übereinstimmende Bereiche werden durch kurze Sequenzeinschübe von 5 bis 6 Basen voneinander getrennt. Ein zusätzliches CUCCU-Sequenzmotiv lässt sich bei csRNA4 und csRNA5 im vorderen Bereich identifizieren. In Analogie hierzu ist in den anderen drei csRNAs an dieser Stelle auch je eine UCCU-Sequenz auffindbar. Bei allen csRNAs lässt sich eine anti-AUG- gefolgt von einer anti-SD-Sequenz finden: CAU-N6-CUCC. Dieser Bereich ist bei allen csRNAs identisch. Nach der anti-AUG-

Sequenz folgt ein Abschnitt von fünf Uridinen. Die Terminatorstrukturen und hier besonders der zweite Arm, welcher bei allen csRNAs so gut wie aus den gleichen Basen besteht, sind ebenfalls sehr ähnlich zueinander.

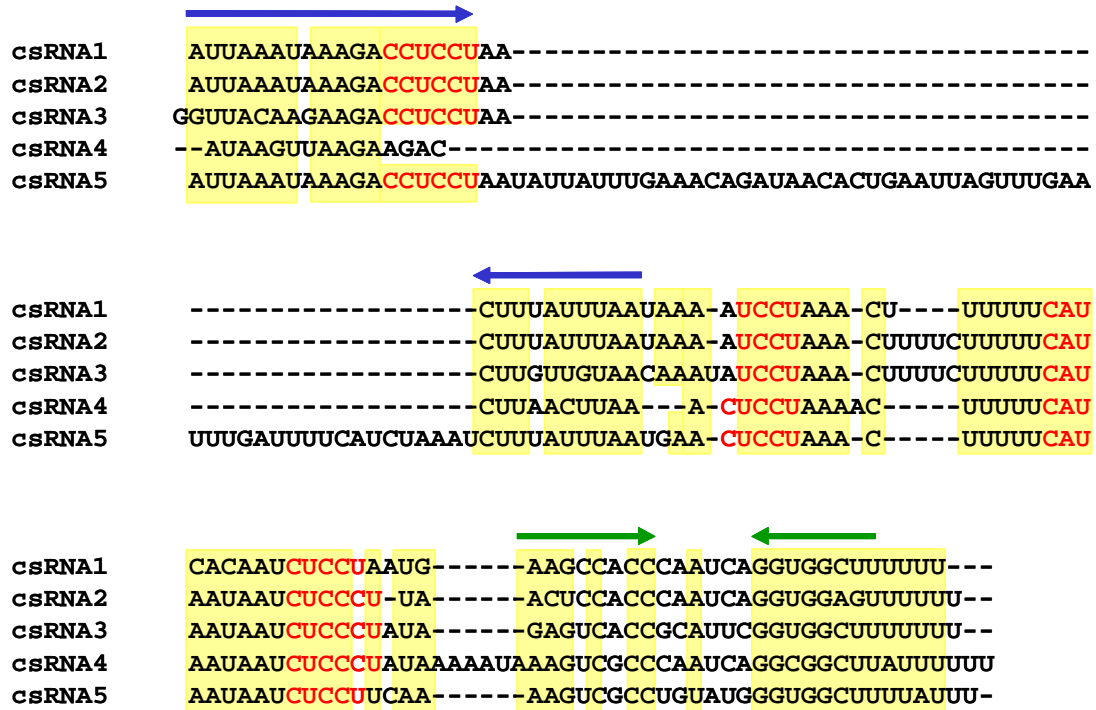


Abbildung 4.14: Sequenzvergleich der csRNAs mittels Multalign (Corpet, 1988). Die Basenabfolge der csRNAs wurde dargestellt. Die Bereiche, in welchen vier von fünf Basen identisch sind, wurden gelb unterlegt. Die anti-SD- und anti-AUG-Sequenzen wurden rot dargestellt. Die beiden Arme der ersten Stämme wurden mit blauen Pfeilen markiert. Die Basen der Terminatorstämme wurden mit grünen Pfeilen markiert.

4.3 Untersuchung der Expression der stromabwärts der csRNA-Gene lokalisierten Gene *ruvB*, *spr0022*, *uppS* und *gpmB*

In vorangehenden Arbeiten (Mascher *et al.*, 2003; Merai, 2003) wurde das *uppS*-Gen, welches stromabwärts von *ccnD* lokalisiert ist, als CiaRH-reguliert diskutiert. Diese Annahme basierte auf Bandshift-Assays mit aufgereinigtem CiaR und einem genomweiten DNA-Bindeassay. Bei beiden Assays wurden chromosomale DNA-Fragmente untersucht, welche die CiaR-box stromaufwärts von *ccnD* beinhalteten. Dementsprechend wurden die Fragmente von CiaR gebunden. Zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen war jedoch weder die CiaR-Bindestelle, noch die Gene für die kleinen RNAs bekannt. Hieraus folgte die Annahme, dass das *uppS*-Gen von dem damals noch unbekannten CiaR-Promotor aus reguliert wird. Im Widerspruch hierzu tauchte das *uppS*-Gen nicht unter den CiaR-regulierten Genen bei den Microarray-Analysen auf. Diese Ergebnisse lassen sich heute, nach der

Entdeckung der kleinen RNAs, einfach erklären: Stromaufwärts von *ccnD* band das CiaR-Protein sowohl im Bandshift Assay, als auch im genomweiten DNA-Bindeassay, wodurch sich die beschriebene Interpretation der Ergebnisse ergab. Jedoch wird nicht das *uppS*-Gen reguliert, wie damals angenommen, sondern *ccnD*. Anhand der neuen Erkenntnisse, welche auch von den damaligen Microarray-Daten unterstützt werden, muss von einer CiaR-unabhängigen Expression des *uppS*-Gens ausgegangen werden. Von *ruvB*, welches sich stromabwärts von *ccnB* befindet und von *gpmB* stromabwärts von *ccnE* sind ähnliche Daten bekannt. Beide stromaufwärts-Regionen banden ebenfalls im genomweiten DNA-Bindeassay. Auch hier konnte die Regulation der Gene nicht mittels Microarray-Analyse bestätigt werden. Dies deutet ebenfalls auf eine CiaR-unabhängige Expression. Um die CiaR-unabhängige Expression der stromabwärts des *ccn*-Gene liegenden Gene zu verifizieren und zu bestätigen, wurden die Promotoren dieser Gene kartiert und ihre Expression mittels realtime RT-PCR untersucht.

4.3.1 Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der Gene *ruvB*, *spr0022*, *uppS* und *gpmB*

Die Identifizierung der Transkriptionsstartpunkte wurde mittels 5'-RACE-Analyse durchgeführt. Hierbei wird zunächst ein RNA-Oligo mit bekannter Sequenz an das 5'-Ende der mRNA ligiert. Hierfür muss am 5'-Ende der mRNA zuerst ein Pyrophosphat abgespalten werden. Mittels reverse Transkription mit genspezifischen Primern wird die zu untersuchende mRNA in cDNA umgewandelt. Anschließend wird die cDNA durch PCR mit einem genspezifischen und einem oligospezifischen Primer amplifiziert und die erhaltenen Fragmente werden sequenziert.

Mittels 5'-RACE-Analyse konnten die Promotoren aller vier Gene bestimmt werden. Diese sind in der Abbildung 4.15 dargestellt.

Für *ruvB* ergab die Analyse einen Transkriptionsstartpunkt, welcher genau an der Position des annotierten Startcodons liegt. Entweder ist hier also von einer leaderless mRNA auszugehen oder die Translation des Gens beginnt an einem anderen stromabwärts liegenden Codon. Ein solches alternatives Startcodon befindet sich 24 bp stromabwärts. Eine für die Translationsinitiation benötigte Shine-Dalgarno-Sequenz ist nicht vorhanden. Vor dem +1 befindet sich eine -10 Region der Sequenz TGNTATAAT. Diese -10 Sequenz stellt eine extended -10-Region dar (Schultzenberger *et al.*, 2007). Eine -35 Region konnte nicht identifiziert werden. Promotoren mit extended -10 Regionen, jedoch ohne eine -35 Region, wurden in Streptokokken bereits beschrieben und ihre Aktivität konnte gezeigt werden (Sabelnikov *et al.*, 1995).

Der Transkriptionsstartpunkt des *spr0022*-Gens befindet sich 26 bp stromaufwärts des Startcodons. Auch hier ist eine extended -10 Region der Sequenz TGNTATAAT vorgeschaltet. Eine -35 Region ist auch hier nicht erkennbar.

Der Transkriptionsstart des *uppS*-Gens befindet sich 9 bp stromaufwärts des annotierten Startcodons. Stromaufwärts des Transkriptionstartpunktes ist ebenfalls eine extended -10-Region lokalisiert. Die *uppS*-mRNA besitzt somit eine sehr kurze Leadersequenz, welche keine Translationsinitiationssignale aufweist. Ein alternatives Startcodon kann 18 bp stromabwärts des annotierten Startcodons identifiziert werden. Eine verkürzte Shine-Dalgarno-Sequenz AGGA ist vor diesem möglichen Startcodon lokalisiert.

Der Promotor des *gpmB*-Gens wurde ebenfalls mittels 5'-RACE-Analyse kartiert. Der Transkriptionsstartpunkt des Gens befindet sich 41 bp stromabwärts des annotierten Startcodons. Dieses Startcodon ist das erste TTG innerhalb des offenen Leserasters. Ein alternatives Startcodon ist 16 bp stromabwärts des Transkriptionstartpunktes vorhanden. Eine Shine-Dalgarno-Sequenz ist ebenfalls vor diesem alternativen Startcodon vorhanden.

```

TTTTGTTTGTGGCTTGGTTTTTTTGGATATAATAGAGCCATGAGTAGAATTTGATAATGGGGGATGAGGAGTTAGTA
>>.....ruvB'.....>

GCTTTTTTTGTGTTGGGATTCAATGATATAATAATAAAATCGATAAGTAGGAAAAAGAGATGTATTATAC
>>spr0022'>

GATAGAAGAAAATGGGGAAATATGGTATAATGAAACGATAGATTTTGAATAGGAATAAGATCATGTTTGGATTT
>>.....uppS'.....>

ATGGGTGGCTTTTATTTTATCATTTCATGATATAATAGAAGCAACGGAGGACGGAAAATGTTAAAAGTACGATTG
>>.....gpmB'.....>

```

Abbildung 4.15: Promotorregionen von *ruvB*, *spr0022*, *uppS* und *gpmB*. Gelb markiert sind die -10-Regionen der Gene, -35-Regionen sind nicht eindeutig erkennbar. Grün markiert sind die mittels 5'-RACE-Analyse bestimmten Transkriptionsstartpunkte. Die in der Genomsequenz von R6 von Hoskins *et al.* annotierten Startcodons sind fett gedruckt. Alternative Startcodons sind pink unterlegt und die dazugehörigen Translationsinitiationssignale sind blau dargestellt.

4.3.2 Bestätigung der CiaRH-unabhängigen Expression von *ruvB*, *spr0022*, *uppS* und *gpmB* mittels realtime RT-PCR

Die Expressionstärke der Gene in den Stämmen R6 *ciaR::aad9* mit deletiertem *ciaR* und R6^{ciaHC306} mit aktiviertem CiaRH-System wurde mit ihrer Expressionsstärke in R6 verglichen.

Bei der Untersuchung der Expression in Stamm R6 *ciaR::aad9* konnten keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden. Die gemessenen Änderungen sind kleiner als 1,5-fach.

Die Expression vom *uppS* und *gpmB* ist in R6^{ciaHC306} um mehr als das 1,5-fache verändert. Bei *gpmB* konnte ein Unterschied von 2,24 gemessen werden.

Die Ergebnisse der realtime RT-PCR-Untersuchung zeigen eindeutig, dass das CiaRH-System keine Rolle für die Expression der stromabwärts liegenden Gene im Wildtyp R6 spielt. Eine sehr geringe Erhöhung der Expression ist in R6^{ciaHC306} bei *uppS* und vor allem bei *gpmB* zu sehen. Dies könnte durch eine ineffiziente Transkriptionstermination von *ccnD* und *ccnE* und ein daraus resultierendes Durchlesen der stromabwärts liegenden Gene durch die RNA-Polymerase verursacht werden.

Gen	R6	R6 <i>ciaR::aad9</i>	R6 ^{ciaHC306}
<i>ruvB</i>	1	1,37 ± 0,03	1,16 ± 0,17
<i>spr0022</i>	1	0,78 ± 0,14	1,09 ± 0,38
<i>uppS</i>	1	0,84 ± 0,12	1,55 ± 0,11
<i>gpmB</i>	1	0,81 ± 0,06	2,24 ± 0,18

Tabelle 4.2: Die Expression der stromabwärts der csRNA-Gene liegenden Gene in *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* und *S. pneumoiniae* R6^{ciaHC306}.

Die Expression der Gene bei inaktivem CiaR und aktiviertem CiaRH-System wurde untersucht. Die Expression der Gene wurde im Wildtypstamm gleich 1 gesetzt. Die Expression in den Stämmen R6 *ciaR::aad9* und R6^{ciaHC306} ist als x-fache Veränderung, verglichen zu R6 berechnet. Ein Unterschied größer als 1 zeigt eine Erhöhung der Expression und kleiner als 1 eine Erniedrigung der Expression, verglichen zu R6, an. Die Standardabweichungen sind angegeben.

4.4 Inaktivierung der *ccn*-Gene

Im ersten Teil der Arbeit wurden die CiaRH-abhängigen kleinen RNAs nachgewiesen und genetisch kartiert. Um nun die Zusammenhänge zwischen den csRNAs und den CiaRH-abhängigen Phänotypen, wie das Lyseverhalten und Kompetenzverhalten, untersuchen zu können, wurden Stämme mit inaktivierten csRNAs hergestellt. Die Gene für die csRNAs (*ccnA-E*) wurden hierbei samt ihren CiaR-regulierten Promotoren deletiert. Sie wurden durch verschiedene Antibiotikaresistenz-vermittelnde Gene ersetzt. In allen außer einem Konstrukt wurden die Kassetten in der gleichen Orientierung wie die *ccn*-Gene integriert. Die Auswirkung der integrierten Resistenz-Kassetten auf die stromabwärts von ihnen liegenden Gene wurde mittels quantitativer realtime RT-PCR untersucht.

4.4.1 Konstruktion von Stämmen mit deletierten csRNA-Genen

Inaktivierung von *ccnA* und *ccnB*

Beide Gene befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander und wurden in diesem Ansatz gemeinsam deletiert. Die Region zwischen 54 bp stromaufwärts des *ccnA*-Gens und 72 bp stromabwärts des *ccnB*-Gens wurde mit der *ermAM*-Kassette, welche eine Erythromycinresistenz vermittelt, ersetzt. *ermAM* besitzt einen eigenen Promotor. Die Expression des Gens in *S. pneumoniae*

R6 vermittelt eine Erythromycinresistenz von 1 µg/ml. Die Expression des stromabwärts liegenden *ruvB*-Gens wurde im Deletionsstamm mittels realtime RT-PCR-Analyse untersucht. Es konnte keine veränderte Transkriptmenge beobachtet werden. Damit bewirkt diese Konstruktion keinen polaren Effekt auf *ruvB*.

Ein 845 bp stromaufwärts-Fragment wurde mit den Primern 236K und 237tag5 amplifiziert. Das stromabwärts-Fragment war 881 bp lang und wurde unter Verwendung der Primer tag3interF und *ruvK* amplifiziert. Die Primer 237tag5 und tag3interF besitzen überhängende den Primern *ermAM*for und *ermAM*rev komplementäre Sequenzen, welche für die Amplifikation des 945 bp langen *ermAM*-Fragments verwendet wurden, waren. Die amplifizierte Sequenz befindet sich zwischen bp 103 bis 1047 auf der *ermAM*-Sequenz (GenBank Nr. Y00116). Unter Verwendung der Primer 236F und *ruvR1* wurde mittels überlappender PCR aus den drei Fragmenten ein großes Fragment produziert und in *S. pneumoniae* R6 transformiert. Die Integration des *ermAM*-Gens erfolgte in der gleichen Orientierung wie die Gene *ccnA* und *ccnB*. Der erhaltene Stamm wurde *S. pneumoniae* RK12 genannt. Die Zahlen 1 und 2 stehen für die deletierten *csRNA1* und *csRNA2*.

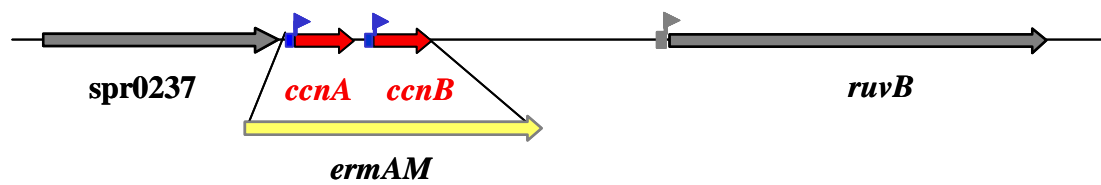


Abbildung 4.16: Deletion von *ccnA* und *ccnB*. Eine 2,5 kb große Region um die *csRNA*-Gene *ccnA* und *ccnB* ist dargestellt. Die *CiaRH*-regulierten Promotoren wurden blau und die *ccn*-Gene rot markiert. Beide Gene wurden gemeinsam deletiert und mit dem Erythromycin-Resistenz vermittelnden *ermAM* ersetzt.

Inaktivierung von *ccnA*

Zur Inaktivierung von *ccnA* wurde ein Fragment von 54 bp stromaufwärts bis 8 bp stromabwärts von *ccnA* ebenfalls mit der *ermAM*-Kassette ersetzt. Um möglichst keine Auswirkung auf die Expression des unmittelbar stromabwärts liegenden *ccnB* zu bewirken, wurde das *ermAM*-Gen bei dieser Deletion in die entgegengesetzte Richtung integriert. Die Expression des stromaufwärts von *ccnA* liegenden *spr0237* wurde bei der quantitativen realtime RT-PCR-Analyse im Deletionsstamm unverändert vorgefunden.

Das 845 bp stromaufwärts-Fragment wurde mit den Primern 236K und *RNA1tag3* amplifiziert. Das 1138 bp stromabwärts-Fragment wurde mit den Primern *RNA1tag5* und *ruvK* amplifiziert. Das eingesetzte *ermAM*-Fragment war das gleiche, wie bereits zuvor beschrieben wurde. Die überlappende PCR wurde mit den entsprechenden Primern durchgeführt. Der erhaltene Stamm wurde *S. pneumoniae* RK1 genannt. Die Zahl 1 steht für die deletierte *csRNA1*.

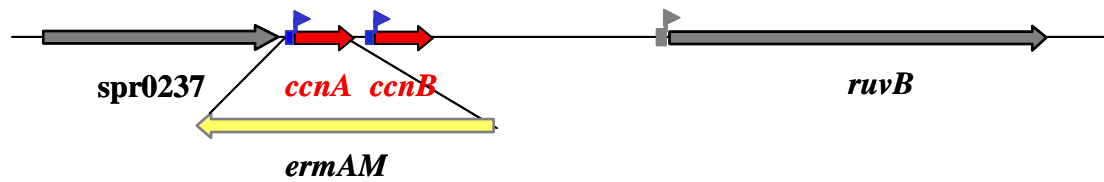


Abbildung 4.17: Deletion von *ccnA*. Eine 2,5 kb große Region um die csRNA-Gene *ccnA* und *ccnB* ist dargestellt. Die CiaRH-regulierten Promotoren wurden blau und die *ccn*-Gene rot markiert. Das *ccnA*-Gen wurde durch das *ermAM*-Gen ersetzt. Diese Kassette wurde in der entgegengesetzten Richtung integriert.

Inaktivierung von *ccnB*

Die *ccnB*-Deletion begann 72 bp stromaufwärts und endete 72 bp stromabwärts von *ccnB*. Erneut wurde die *ermAM*-Kassette verwendet. Die quantitative realtime RT-PCR-Analyse von *ruvB* zeigte auch hier keinen polaren Effekt an.

Das 1025 bp stromaufwärts-Fragment wurde mit den Primern 236K und RNA2tag5 amplifiziert. Das stromabwärts-Fragment wurde mit den Primern tag3interF und *ruvK* amplifiziert. Die überlappende PCR wurde mit den oben beschriebenen Primern durchgeführt. Die *ermAM*-Kassette wurde in gleicher Orientierung wie *ccnB* integriert. Der erhaltene Stamm wurde *S. pneumoniae* RK2 genannt. Die Zahl 2 steht für die deletierte csRNA2.

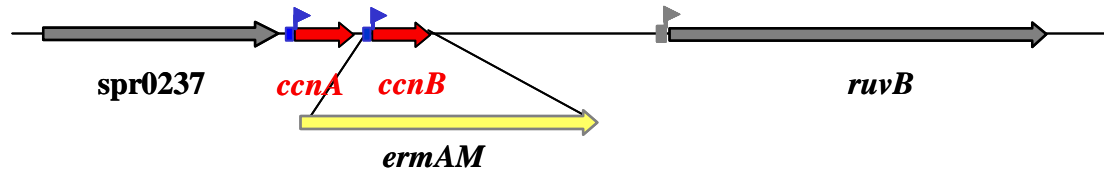


Abbildung 4.18: Deletion von *ccnB*. Eine 2,5 kb große Region um die csRNA-Gene *ccnA* und *ccnB* ist dargestellt. Die CiaRH-regulierten Promotoren wurden blau und die *ccn*-Gene rot markiert. *ccnB* wurde durch das *ermAM*-Gen ersetzt. Diese Kassette wurde in der gleichen Richtung wie *ccnB* integriert.

Inaktivierung von *ccnC*

Im Fall von *ccnC* wurde eine Region, beginnend 37 bp stromaufwärts bis 27 bp vor das 3'-Ende von *ccnC* deletiert. Die letzten 27 bp von *ccnC* wurden nicht entfernt, um möglichst keinen Einfluss auf den unmittelbar 16 bp stromabwärts von *ccnC* lokalisierten Promotor des spr0022-Gens zu nehmen. Das Spectinomycinresistenz-Gen *aad9* (GenBank Nr. M69221) wurde für die Deletion eingesetzt. Dieses Gen besitzt einen eigenen Promotor und einen Terminator. Die Expression des Gens in *S. pneumoniae* R6 vermittelt eine Spectinomycinresistenz von 80 µg/ml. Die quantitative realtime RT-PCR-Analyse von spr0022 zeigte keinen polaren Effekt ausgehend von *aad9* an.

Das 933 bp stromaufwärts-Fragment wurde mit den Primern purK1 und purR amplifiziert. Das stromabwärts-Fragment wurde mit den Primern 22F1 und *dut1* generiert. Das *aad9*-Fragment wurde mit den Primern *aad9_1* und *aad9_2* generiert und bestand aus den ersten 1121 bp der publizierten

Sequenz. Die Primer purR und 22F1 und die *aad9*-Primer besitzen *NheI*-Schnittstellen. Die PCR-Fragmente wurden mit *NheI* verdaut und ligiert. Mit einem Teil des Ligationsansatzes wurde *S. pneumoniae* R6 transformiert. Einige Transformanten wurden analysiert. Das Gen *aad9* befand sich in der gleichen Orientierung wie *ccnC*. Der erhaltene Stamm wurde *S. pneumoniae* RK3 genannt. Die Zahl 3 steht für die deletierte csRNA3.

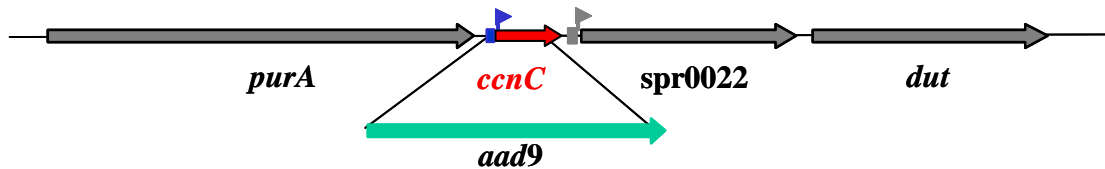


Abbildung 4.19: Deletion von *ccnC*. Eine 2,5 kb große Region um das csRNA-Gen *ccnC* ist dargestellt. Der CiaRH-regulierte Promotor wurde blau und *ccnC* rot markiert. *ccnC* wurde durch das *aad9*-Gen ersetzt. Die Kasette wurde in der gleichen Richtung wie *ccnC* integriert.

Inaktivierung von *ccnD*

Die Deletion von *ccnD* beginnt 29 bp stromaufwärts von *ccnD* und endet 7 bp vor dem 3'-Ende des Gens. Zwischen dem 3'-Ende von *ccnD* und dem Promotor des *uppS*-Gens befinden sich 63 bp. *ccnD* wurde mit dem Kanamycin-Resistenz vermittelnden Gen *aphIII* (GenBank Nr. V01547) ersetzt. Die Expression des Gens in *S. pneumoniae* R6 bewirkt eine Kanamycinresistenz von 200 µg/ml. Die Konstruktion des *ccnD*-Deletionsstammes war mit einigen Schwierigkeiten verbunden. Bei den ersten beiden Konstrukten war die Expression des stromabwärts liegenden *uppS* erhöht.

ccnD wurde in einem ersten Ansatz mit dem Terminator-losen *aphIII* ersetzt. Das *aphIII*-Fragment wurde hierbei von der Janus-Kassette (Sung *et al.*, 2001), die bei *S. pneumoniae* oft zur Deletion von Genen eingesetzt wird, amplifiziert. Die Kasette besitzt hier einen veränderten Promotor. Die realtime RT-PCR-Analyse des *uppS*-Gens im Deletionsstamm zeigte, dass die Expression dieses Gens um das zwölfwache erhöht war.

Um diesen starken polaren Effekt umgehen zu können, wurde ein neues Konstrukt erstellt. Hier wurde das *aphIII* ohne eigenen Promotor stromabwärts des CiaR-Promotors von *ccnD* integriert, wodurch die Expression des Gens von diesem Promotor aus erfolgte. Außerdem wurde der Terminator des *aphIII*-Gens miteingesetzt. Die realtime RT-PCR-Analyse des *uppS*-Gens zeigte immer noch eine über 2,5-fach erhöhte Expression an.

Bei der dritten unten beschriebenen Konstruktion wurde *aphIII* ohne jeglichen Promotor und mit einem verstärkten Terminator integriert. Hierbei erfolgt die Expression von *aphIII* einzig durch die Durchleeseaktivität am stromaufwärts liegenden spr0239-Gen. Die realtime RT-PCR-Analyse zeigte, dass diese Konstruktion keine Auswirkung auf die Expression des *uppS* hat. Die genaue Konstruktion ist im Folgenden beschrieben.

Das 1063 bp stromaufwärts-Fragment wurde mit uppS5 und uppS2C amplifiziert. Das 997 bp stromabwärts-Fragment wurde mit uppS3B und uppS6 amplifiziert. Das 871 bp lange *aphIII*-

Fragment erstreckte sich von bp 513 bis 1383 der publizierten *aphIII*-Sequenz und wurde mit *aph1A* und *aph2* amplifiziert. Die Primer *uppS2C* und *uppS3B* überlappen mit *aph1A* und *aph2*. Die überlappende PCR wurde mit *uppS1* und *uppS4* ausgeführt. Das *aphIII*-Gen befindet sich in gleicher Orientierung wie die flankierenden Gene und *ccnD*. Der erhaltene Stamm wurde *S. pneumoniae* RK4 genannt. Die Zahl 4 steht für die deletierte csRNA4.

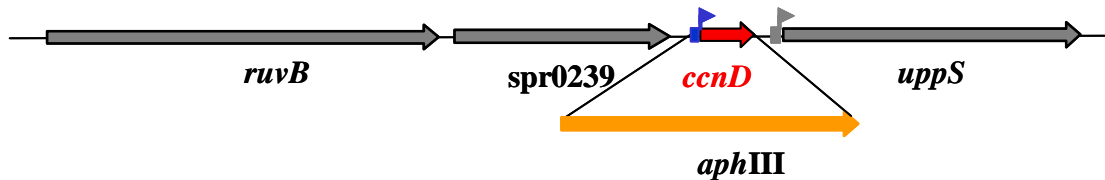


Abbildung 4.20: Deletion von *ccnD*. Eine 2,5 kb große Region um *ccnD* ist dargestellt. Der CiaRH-regulierte Promotore wurde blau und *ccnD* rot markiert. *ccnD* wurde durch das *aphIII*-Gen ersetzt. Die Kassette wurde in die gleiche Richtung wie *ccnD* integriert.

Inaktivierung von *ccnE*

Der Deletion von *ccnE* beginnt 30 bp stromaufwärts von *ccnE* und endet 33 bp stromaufwärts seines 3'-Endes. Die letzten 33 bp von *ccnE* wurden nicht deletiert, weil sich hier eine Überlappung zwischen der Terminatorsequenz von *ccnE* und des stromabwärts liegenden *gpmB* befindet. Die Überlappung entsteht durch die Annotation des *gpmB*-Startcodons (Hoskins *et al.*, 2001). Das tatsächliche Startcodon befindet sich höchstwahrscheinlich, wie in Abbildung 4.15 dargestellt, 57 bp stromabwärts diesen Codons. Um jedoch das annotierte Startcodon nicht zu deletieren, wurden die letzten 33 bp von *ccnE* nicht deletiert. Das Gen wurde mit der neu konstruierten Chloramphenicol-Resistenz-Kassette (Konstruktion siehe Abschnitt 3.6) ersetzt. Das Gen besitzt einen eigenen Promotor und einen Terminator. Die Expression des Gens in *S. pneumoniae* R6 vermittelt eine Chloramphenicolresistenz von 3 µg/ml. Die Expression des *gpmB*-Gens war im Deletionsstamm unverändert.

Das 1172 bp stromaufwärts-Fragment wurde mit den Primern *gpmB5* und *gpmB2* amplifiziert. Das 632 bp stromabwärts-Fragment wurde mit den Primern *gpmB3* und *gpmB6* amplifiziert. Zur Amplifikation des *cat*-Fragments wurden die Primer *veg5* und *cat2* verwendet, welche *SphI*-Überhänge besaßen.

Die Primer *gpmB2* und *gpmB3* besaßen ebenfalls *SphI*-Schnittstellen. Die Fragmente wurden mit *SphI* verdaut und ligiert. Ein Teil des Ligationsansatzes wurde in *S. pneumoniae* R6 transformiert. Alle untersuchten Transformanten besaßen das *cat*-Gen in der gleichen Orientierung wie *ccnE*. Der erhaltene Stamm wurde *S. pneumoniae* RK5 genannt. Die Zahl 5 steht für die deletierte csRNA5.

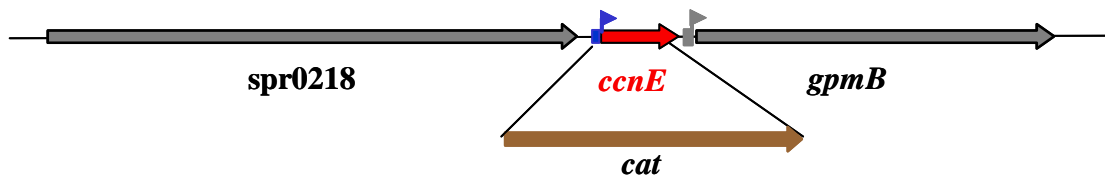


Abbildung 4.21: Deletion von *ccnE*. Eine 2,5 kb große Region um *ccnE* ist dargestellt. Der CiaRH-regulierte Promotor wurde blau und *ccnE* rot markiert. *ccnE* wurde durch das *cat*-Gen ersetzt. Die *cat*-Kassette wurde in der gleichen Richtung wie *ccnE* integriert.

Die oben aufgeführten Deletionskonstrukte wurden in *S. pneumoniae* R6 sowohl einzeln als auch in Kombination eingeführt. Um einzelne csRNAs detektieren und ihre Funktion untersuchen zu können, wurden zusätzlich solche Stämme konstruiert, welche nur bestimmte csRNA-Gene beinhalten. Zudem wurde ein Stamm konstruiert, welcher kein csRNA-Gen mehr enthält. Dieser Stamm wurde *S. pneumoniae* RK12345 genannt. Die in dieser Arbeit hergestellten Stämme, welche nur bestimmte csRNAs besitzen, sind in Tabelle 4.3 aufgelistet.

Tabelle 4.3: Stämme, welche nur bestimmte csRNA-Gene besitzen

Stämme	Vorhandene csRNA
RK12345	keine
RK123	csRNA4, csRNA5
RK45	csRNA1, csRNA2, csRNA3
RK2345	csRNA1
RK1345	csRNA2
RK1245	csRNA3
RK1235	csRNA4
RK1234	csRNA5

4.4.2 Northern Blot-Analyse einzelner csRNAs in Stämmen, welche nur bestimmte csRNA- Gene besitzen

Wie bereits beschrieben, besitzen die csRNAs eine hohe Ähnlichkeit zueinander. Wegen dieser Eigenschaft war es im Wildtypstamm R6 nicht möglich, die einzelnen csRNAs eindeutig zu detektieren. Es ergaben sich Kreuzreaktionen mit den eingesetzten Sonden. Um sicherzustellen, dass tatsächlich alle 5 csRNAs in den Zellen vorhanden sind, sollten diese mit Hilfe der Stämme, welche nur bestimmte csRNA-Gene besitzen, einzeln detektiert werden.

In den verwendeten Stämmen waren jeweils vier csRNA-Gene deletiert. Außerdem wurde der Stamm RK12345 untersucht, in welchem alle 5 csRNA-Gene ausgeschaltet wurden.

Wie auf dem Blot in Abbildung 4.22 ersichtlich, konnten alle 5 csRNAs detektiert werden. Als Kontrolle wurde der Wildtypstamm R6 aufgetragen. Die csRNA1, csRNA2 und csRNA3 befinden

sich zwischen den Markerbanden 70 und 100. csRNA1 läuft auf der Höhe von 89 Basen, csRNA2 auf der Höhe von 91 Basen und csRNA3 auf der Höhe von 95 Basen. Bei csRNA4 in Spur 6 können mehrere definierte Banden in unmittelbarer Nähe zueinander beobachtet werden. Diese Banden befinden sich den Berechnungen zufolge zwischen 87 und 92 Basen. csRNA5 befindet sich auf der Höhe von 141 Basen. Hier ist ein starkes Signal zu sehen. Es können allerdings csRNA5-Abbauspuren auf der Höhe von 125, 107, 104, 102 und 93 Basen beobachtet werden. In Stamm RK12345 können keinerlei Banden gesichtet werden.

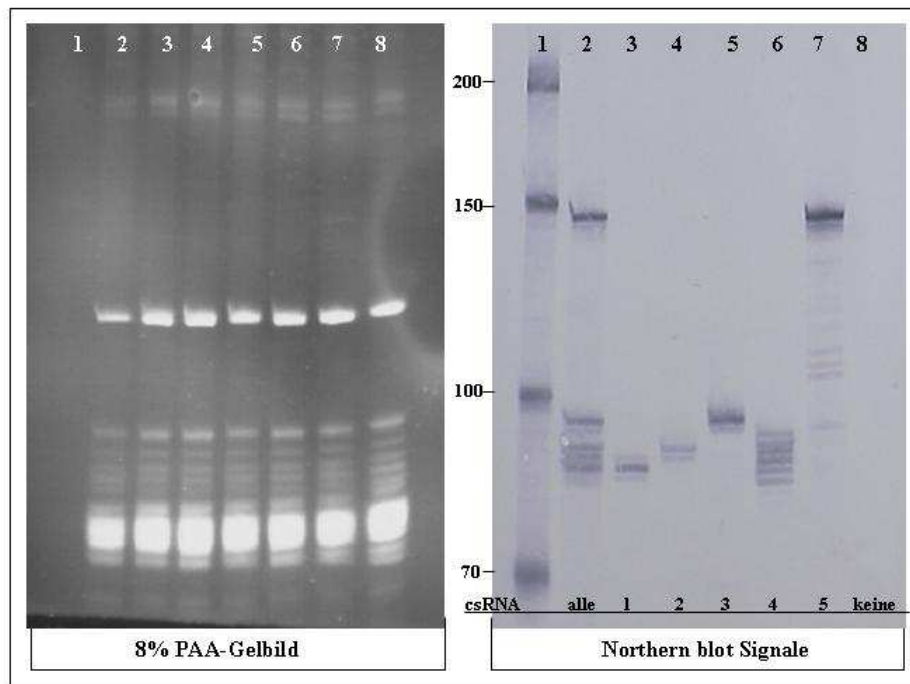


Abbildung 4.22: Signale der einzelnen csRNAs, nach Auftrennung in einem 8% PAA-Gel. Das Ethidium-Bromid gefärbte Gel und ein Abbild der Northern Blot Membran ist dargestellt. Jeweils 3 µg Gesamt-RNA wurden aufgetrennt. Spur 1: Marker; Spur 2: R6, alle csRNAs sichtbar; Spur 3: RK2345, csRNA1 sichtbar; Spur 4: RK1345, csRNA2 sichtbar; Spur 5: RK1245, csRNA3 sichtbar; Spur 6: RK1235, csRNA4 sichtbar; Spur 7: RK1234, csRNA5 sichtbar; Spur 8: RK12345, keine csRNAs vorhanden. Es wurden Sonden (10 pM/ml) für alle fünf csRNAs und für den Marker verwendet.

Im Gel läuft csRNA3 höher als csRNA1, csRNA2 und csRNA4 bei 95 Basen. Auf der Höhe dieser Bande konnte in *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* ein schwaches Signal detektiert werden (siehe Abbildung 4.4). Dementsprechend muss in diesem Stamm noch eine geringe Menge an csRNA3 produziert werden.

4.5 Phänotypische Charakterisierung der *ccn*-Deletionsstämme

Die phänotypische Charakterisierung der *ccn*-Deletionsstämme sollte erste Hinweise auf die Funktion der csRNAs erbringen. Die Rolle der csRNAs in den CiaRH-assoziierten Phänotypen sollte ebenfalls untersucht werden. Hierzu wurde das Wachstums- und Lyseverhalten, sowie die natürliche Transformierbarkeit der csRNA-Inaktivierungsstämme untersucht.

4.5.1 Untersuchung des Wachstums- und Lyseverhalten der *ccn*-Deletionsstämme

Während der Konstruktion der *ccn*-Deletionsstämme konnte ein verändertes Autolyseverhalten bei den Stämmen *S. pneumoniae* RK4 mit inaktivierter csRNA4 und RK5 mit inaktivierter csRNA5 beobachtet werden. Diese Stämme zeigten eine höhere Lyserate als der Wildtypstamm *S. pneumoniae* R6. Durch die Inaktivierung dieser beiden csRNAs in einem Stamm (RK45) konnte die Lyserate nochmals leicht erhöht werden. Bei allen anderen csRNA-Inaktivierungsstämmen blieb die Lyse in der stationären Phase unverändert. Der Stamm *S. pneumoniae* RK12345 ohne jegliche csRNAs, besitzt annähernd das gleiche Lyseverhalten wie *S. pneumoniae* RK45. Die höchste Lyserate konnte in *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* mit inaktiviertem CiaR beobachtet werden. Das Wachstum der konstruierten Stämme war im Vergleich zum Wildtyp leicht verlangsamt, zeigte aber keine wesentliche Veränderung im direkten Vergleich zu *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9*.

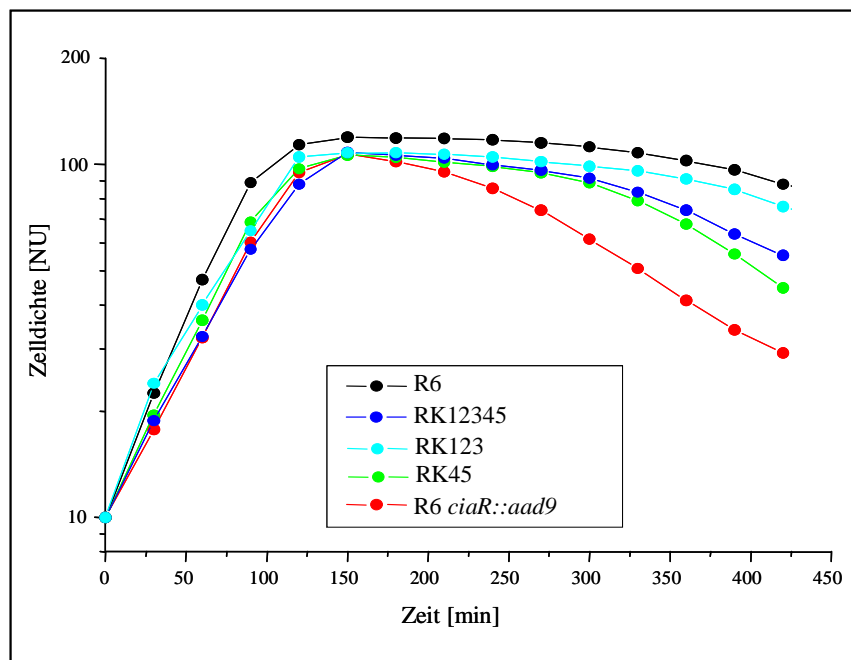


Abbildung 4.23: Wachstumskurven verschiedener *ccn*-Deletionsstämme im Vergleich zum Wildtyp *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9*. Die Wachstumskurve des Wildtyps *S. pneumoniae* R6 ist schwarz, der RK123 ist hellblau, der RK45 ist grün, der RK12345 ist dunkelblau und der R6 *ciaR::aad9* ist rot dargestellt.

Das unveränderte Lyseverhalten des Stammes RK12345 gegenüber RK45 zeigt eindeutig, dass csRNA4 und csRNA5 maßgeblich an der Hemmung der Autolyse in der stationären Phase beteiligt sind. csRNA1, csRNA2 und csRNA3 scheinen bei diesem Prozess keine Rolle zu spielen. Somit konnte gezeigt werden, dass die csRNA4 und csRNA5 am CiaRH-abhängigen Schutzmechanismus gegen die Autolyse beteiligt sind. Die Stärke der Lyserate bei Inaktivierung der csRNAs ist jedoch wesentlich geringer, als bei Inaktivierung des Response Regulators CiaR, welche die Inaktivierung des gesamten CiaRH-Regulons nach sich zieht.

4.5.2 Untersuchung der natürlichen Transformierbarkeit der *ccn*-Deletionsstämme

Ein weiterer Phänotyp, welcher vom CiaRH-System beeinflusst wird, ist die natürliche Transformierbarkeit. Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Deletion des *ciaR*-Gens zur Transformierbarkeit in THB-Medium führt. Dieses Medium unterdrückt normalerweise die Transformierbarkeit des Wildtypstammes *S. pneumoniae* R6. Um die Rolle der csRNAs bei diesem Prozess zu untersuchen, wurde der Stamm RK12345, welcher keine csRNA mehr enthält, in THB-Medium transformiert. Es konnten keine Transformanten selektioniert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die csRNAs nicht die hemmenden Faktoren bezüglich der Transformation in THB-Medium darstellen.

Die Transformierbarkeit wurde ebenfalls in C-Medium untersucht. In diesem Medium ist sowohl der Wildtypstamm R6 und als auch R6 *ciaR::aad9* transformierbar. Der Wildtypstamm R6 zeigte eine ausgedehnte transformierbare Phase von Nephelo 20 bis Nephelo 60. Der Anteil der transformierten Zellen an der Lebendkeimzahl (Transformationseffizienz) betrug maximal 0,8%. R6 *ciaR::aad9* war in dieser Wachstumsphase ebenfalls transformierbar, es konnte jedoch nach einer maximalen Transformationseffizienz von über 0,9% bei Nephelo 20 ein schneller Abfall der Kompetenz beobachtet werden. Der Stamm RK12345 mit deletierten csRNAs erreichte maximal eine Transformationseffizienz von 0,1%, was achtfach niedriger ist, als die im Wildtypstamm R6 erreichte Effizienz. Ähnlich erniedrigt war die Transformierbarkeit des Stammes RK123. Der Stamm RK45 zeigte einen Peak von über 0,5% bei Nephelo 20. Danach konnte ein schneller Abfall der Transformationseffizienz beobachtet werden.

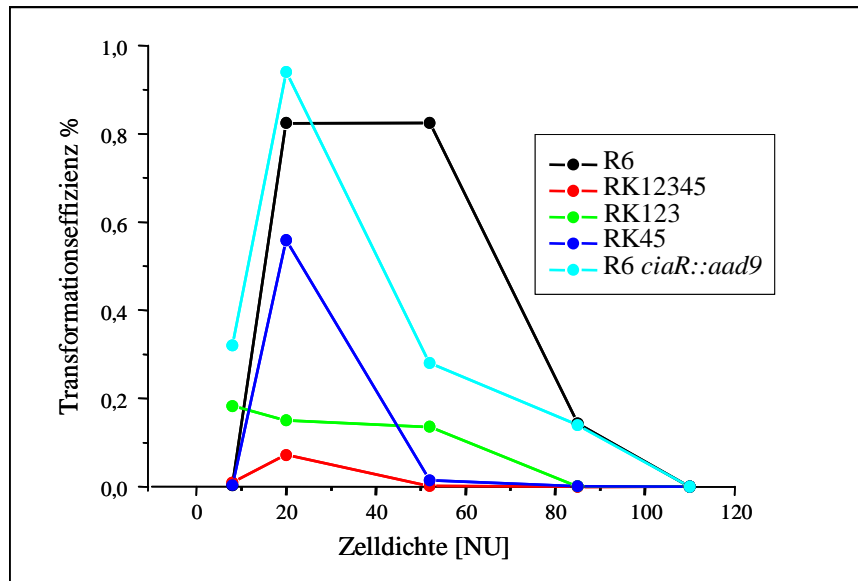


Abbildung 4.24: Die Transformationseffizienz verschiedener *ccn*-Deletionsstämme im Vergleich zum Wildtyp *S. pneumoniae* R6 und *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9*. Auf der X-Achse ist die Zelldichte in Nephelo-Units dargestellt. Die Transformationseffizienz in Prozent (der Anteil transformierter Zellen an der Lebendkeimzahl) befindet sich auf der Y-Achse. Der Wildtyp R6 ist schwarz, RK12345 ist rot, RK123 ist grün, RK45 ist dunkelblau und *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* ist hellblau dargestellt.

Die Ergebnisse der Untersuchung der natürlichen Transformierbarkeit des Stammes RK12345, RK123 und RK45 deuten auf einen Zusammenhang zwischen den kleinen nichtkodierenden RNAs und der natürlichen Transformierbarkeit von *S. pneumoniae* R6. Alle drei untersuchten Stämme zeigten eine erniedrigte Transformierbarkeit. Bei R6 *ciaR::aad9* konnte dieser Phänotyp nicht beobachtet werden. Es konnte lediglich eine Verschiebung des Kompetenzpeaks in Richtung niedrigerer Zelldichten festgestellt werden. Die achtfache Erniedrigung der Transformierbarkeit des Stammes RK12345 steht im Widerspruch zur vollen Transformierbarkeit des Stammes mit deletiertem *ciaR*.

4.6 Suche nach den csRNA-Zielgenen

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, konnte durch die Deletion der Gene für die csRNAs deren Einfluß auf die Transformierbarkeit und das Lyseverhalten aufgedeckt werden. Diese phänotypischen Veränderungen können nach jetzigen Vorstellungen durch Regulation der Expression von Proteinen, welche in diese Prozesse involviert sind, hervorgerufen werden. Anhand bisheriger Untersuchungen bei verschiedenen Organismen sind nichtkodierende RNAs an der Regulation der Translation von mRNAs beteiligt. Ihre Funktion besteht oft in der Hemmung der Translation durch Blockierung der Ribosomenbindestelle. In wenigen Fällen können sie aber auch stabilisierend auf die mRNA-Struktur wirken und dadurch die Translation verbessern. Gene, welche durch kleine RNAs reguliert werden, werden als RNA-Zielgene bezeichnet.

Die Identifizierung der csRNA-Zielgene steht im Folgenden im Mittelpunkt des Interesses. Die Suche nach den Zielgenen erfolgte mit drei verschiedene Methoden. Zuerst wurde eine Microarray-basierte Transkriptomanalyse durchgeführt. In einem nächsten Ansatz wurden Ganzzelllysate des Wildtyps *S. pneumoniae* R6 und von *S. pneumoniae* RK12345 auf SDS-Gelen aufgetrennt und auf veränderte Mengen von Proteinen untersucht. Als dritte Methode wurden mit verschiedenen Computerprogrammen Zielgen-Vorhersagen erstellt.

4.6.1 Microarray-basierte Transkriptomanalyse des Wildtyps *S. pneumoniae* R6 und von *S. pneumoniae* RK12345

Kleine nichtkodierende RNAs können, wie in der Einleitung beschrieben, an komplementäre Bereiche ihrer Zielgene binden. Dabei kann es zu einer veränderten Translation der Zielgene kommen. Gleichzeitig kann die mRNA des Zielgens durch verschiedene RNasen abgebaut werden. Sollte es durch die Interaktion der csRNAs und der Zielgen-mRNAs zum starken Abbau der Zielgen-mRNAs kommen, könnten durch eine vergleichende Transkriptomanalyse des Wildtypstammes R6 und des *ccnABCDE*-Inaktivierungsstammes RK12345 Veränderungen der mRNA-Mengen detektiert werden.

Drei unabhängige Kulturen wurden in C-Medium bis zu einer Nephelo von 50 herangezogen und abzentrifugiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und zur Analyse eingesetzt. Lediglich die Transkriptmenge eines einzigen annotierten Gens wurde um mehr als zweifach signifikant verändert vorgefunden. Bei diesem Gen handelte es sich um *comX2*, welches im Wildtypstamm R6 2,05-fach höher exprimiert war als im csRNA-Deletionsstamm *S. pneumoniae* RK12345. Obwohl die Veränderung relativ gering ist, wurde dieses Gen bei den weiteren Analysen mit einbezogen.

Im Wildtypstamm R6 wurde zudem eine 2,87-fach höhere mRNA-Menge eines intergenen Bereichs (Microarray-Oligo AE007317_273258) detektiert. Dieses Oligo entspricht der Sequenz zwischen den Positionen 273283-273352 bp im Genom von *S. pneumoniae* R6. Der Intergenbereich befindet sich

zwischen den Genen *rpsI* und der nachfolgenden Transposase B. Das Oligo AE007317_273258 liegt zum Teil in der Terminatorstruktur von *rpsI*. Es konnte keine Promotorregion in unmittelbarer Nähe gefunden werden und es konnten auch keine zu den csRNAs komplementären Sequenzen in dieser Region nachgewiesen werden. Aus diesen Gründen wurde diese Region nicht weiter untersucht.

4.6.2 Suche nach csRNA-Zielgenen anhand veränderter Proteinmengen in Gesamtzelllysaten auf SDS-Gelen

Um Zielgene kleiner RNAs finden zu können, werden oft zweidimensionale Proteingel-Analysen durchgeführt, da eine starke translationelle Regulation eine veränderte Proteinmenge zur Folge hat. Bei den meisten publizierten Untersuchungen werden die kleinen RNAs von einem induzierbaren Promotor überexprimiert und die Ganzzelllysate mit dem des Wildtypstamms verglichen. Die auf dem Gel identifizierten veränderten Protein-Spots werden anschließend, um das entsprechende Protein identifizieren zu können, massenspektrometrisch untersucht.

Eine Überexpression der csRNAs konnte während dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da die entsprechenden molekularen Tools bei *S. pneumoniae* nicht zu Verfügung standen. Eine einfache Analyse mittels SDS-Gelen wurde jedoch durchgeführt. Diese Methode ist im Allgemeinen bei der Identifizierung von Zielgenen nicht unbedingt üblich, da lediglich eine zu geringe Auflösung erreicht werden kann. Sie wurde jedoch in mindestens einer Publikation erfolgreich angewendet. So konnte in *E. coli* das Zielgen der kleinen RNA GlmZ mittels eindimensionaler SDS-Gelanalysen identifiziert werden (Kalamorz *et al.*, 2007). Bei starker Regulation der Translation und der dadurch entstandenen unterschiedlichen Proteinmengen, welche sich eventuell in einem etwas höher aufgelösten Bereich der Gele befinden, ist eine Detektion vorstellbar. Aus diesen Gründen wurde diese Analyse durchgeführt. Gesamtzelllysate des Wildtypstammes *S. pneumoniae* R6 und des *ccnABCDE*-Inaktivierungsstammes RK12345 wurden bei verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums hergestellt. Diese wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteinbanden verglichen. Es konnten keine quantitativ veränderten Proteinbanden identifiziert werden. Mit dieser Methode konnte somit kein Zielgen für die csRNAs identifiziert werden.

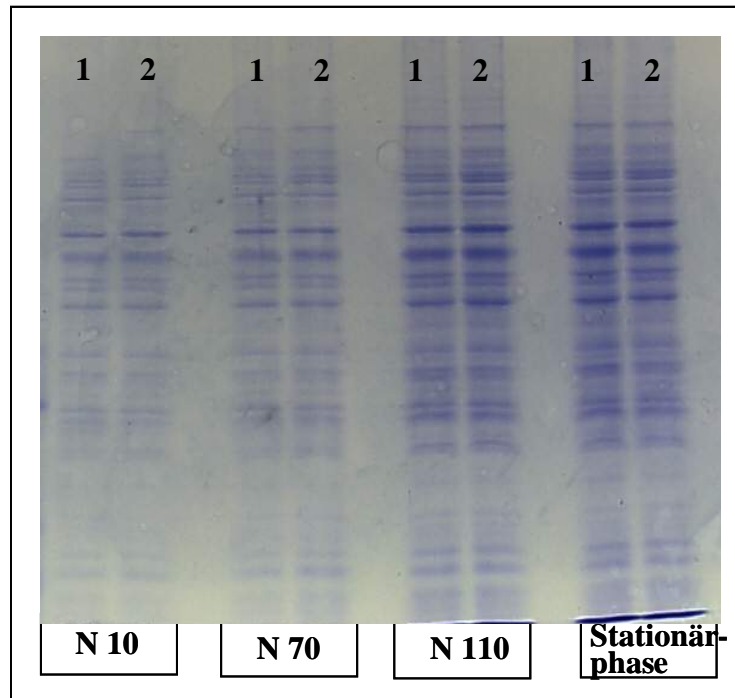


Abbildung 4.25: SDS-Gel der Lysate. Zellysate wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums hergestellt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zahl 1 steht für den Wildtyp *S. pneumoniae* R6. 2 symbolisiert *S. pneumoniae* RK12345. Die Zelldichten in Nephelowerten, bei welchen die Lysate erstellt wurden, sind unten im Bild dargestellt.

4.6.3 Bioinformatische Suche nach den csRNA-Zielgenen

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, konnten mit Hilfe der RNA-Microarrays und der SDS-Proteingel-Analysen keine Zielgene für die csRNAs identifiziert werden. In einem nächsten Schritt wurde mit Hilfe von neu entwickelten Computerprogrammen *in silico* nach den Zielgenen gesucht. Zu Beginn dieser Arbeit stand einzig das Programm TargetRNA (Tjaden *et al.*, 2006) für solche Untersuchungen zur Verfügung. TargetRNA ist unter <http://snowwhite.wellesley.edu/targetRNA/advanced.html> frei zugänglich. Dieses Programm wurde in Anlehnung an Programme, welche bei der Suche nach eukaryotischen miRNA-Zielgenen verwendet werden, entwickelt. Jedoch wurden einige wesentliche Unterschiede zwischen den miRNAs und den prokaryotischen sRNAs, wie z.B. ihre Länge, in die Berechnungen mit einbezogen. Das TargetRNA-Programm sucht nach Komplementarität zwischen einer eingegebenen sRNA-Sequenz und einer in der Größe frei wählbaren Region stromauf- und stromabwärts der Startcodons aller Open Reading Frames in der Genomsequenz eines Organismus. Als Ausgabe werden die Zielgene nach einem Score mit den dazugehörigen P-Values angegeben. P-Values größer oder gleich 0,01 werden als signifikant angenommen. Es werden keine intramolekularen Wechselwirkungen und keine Pseudoknoten berücksichtigt, was oft als Nachteil dieses Programm ausgelegt wird.

Die Zielgensuche mit dem TargetRNA Program wird im weiteren als **Methode 1** bezeichnet. Um die Zielgensuche systematisch gestalten zu können, wurden einige Kriterien zugrunde gelegt. Ein Kriterium bezog sich auf die bei der Suche angewendete csRNA-Sequenz. Bei der Suche wurden die ungepaarten, zwischen den beiden Stem Loops befindlichen Sequenzen berücksichtigt. Das zweite Kriterium bezog sich auf die durchsuchten Regionen im Genom von *S. pneumoniae*. Eine Region 30 bp stromaufwärts und 50 bp stromabwärts aller Startcodons sollte durchsucht werden. Das dritte Kriterium bezog sich auf die Art der Paarungen zwischen den csRNAs und den Zielgenen: GU Paarungen wurden hierbei erlaubt. Die Suche wurde mit diesen Kriterien durchgeführt und die jeweils ersten 20 Zielgene der csRNAs wurden in Listen eingetragen und für die weitere Analyse verwendet. Die jeweils ersten 20 Zielgene sind in der Tabelle 4.4 dargestellt. Der Inhalt dieser Tabelle wird im weiteren Liste 1 genannt.

Score*	csRNA1 Zielgene	csRNA2 Zielgene	csRNA3 Zielgene	csRNA4 Zielgene	csRNA5 Zielgene
1	spr0371	spr1645	spr0822	spr0081	spr0231
2	spr1992	spr1927	spr1645	spr0219	spr0081
3	spr0144	spr0081	spr1927	spr1366	spr0559
4	spr2010	spr 1450	spr1771	spr1097	spr1097
5	spr1874	spr 0822	spr0934	spr1450	spr0127
6	spr0545	spr 1932	spr1932	spr0634	spr1932
7	spr0559	Spr0231	spr0081	spr1785	spr2043
8	spr1494	spr 2043	spr0231	spr0278	spr0532
9	spr1839	spr 0407	spr2043	spr1770	spr0621
10	spr0127	spr0934	spr0407	spr0152	spr0551
11	spr0265	spr 0998	spr2003	spr0545	spr1450
12	spr1359	spr1954	spr1954	spr0785	spr0471
13	spr1483	spr 1970	spr0559	spr0425	spr0472
14	spr1765	spr 0265	spr0602	spr0822	spr0545
15	spr1833	spr 0559	spr0693	spr1419	spr0934
16	spr0791	spr 0693	spr0998	spr0601	spr1382
17	spr1610	spr 1771	spr1408	spr1773	spr0693
18	spr1635	spr 0020	spr1761	spr1932	spr1610
19	spr1711	spr 0471	spr0020	spr2043	spr1919
20	spr1763	spr 0472	spr0471	spr0471	spr1927

Tabelle 4.4 (Liste 1): Die ersten 20 Zielgene der csRNAs. Die Gene wurden mit Hilfe des TargetRNA-Programms (Methode 1) ermittelt. Die jeweils ersten 20 Zielgene der csRNAs sind nach ihrem Score aufgelistet.

*Die Position des Gens in der Rangliste der Zielgene.

Mit Hilfe des Microsoft Office Programms Acces wurde die Zielgenliste weiterbearbeitet. Viele Gene wurden für mehrere csRNAs als Zielgen identifiziert. Somit konnten letztendlich 60 verschiedene

Zielgene detektiert werden. Diese 60 Gene wurden aufgelistet und der dazugehörige Score (Reihenfolge in Liste 1) in der entsprechenden csRNA-Spalte eingetragen. Die Anzahl der Scores wurde in den Zeilen gezählt und in der Spalte „Häufigkeit“ eingetragen. Letztendlich wurden die Zeilen nach den häufigsten Treffern mit mehreren RNAs absteigend sortiert (Tabelle 4.5). Diese Sortierung ergab folgendes Ergebnis: 5 Gene wurden gleichzeitig als Zielgene von 4 csRNAs identifiziert, 7 Gene sind Zielgene dreier csRNAs, 11 Gene werden durch 2 csRNAs getroffen und die restlichen 36 Gene sind Zielgene jeweils nur einer csRNA.

Nummer	Gen	Score*					Häufigkeit
		csRNA1	csRNA2	csRNA3	csRNA4	csRNA5	
1	spr0081		3	7	1	2	4
2	spr0471		19	20	20	12	4
3	spr0559	7	15	13		3	4
4	spr1932		6	6	18	6	4
5	spr2043		8	9	19	7	4
6	spr0231		7	8		1	3
7	spr0545	6			11	14	3
8	spr0693		16	15		17	3
9	spr0822		5	1	14		3
10	spr0934		10	5		15	3
11	spr1450		4		5	11	3
12	spr1927		2	3		20	3
13	spr0020		18	19			2
14	spr0127	10				5	2
15	spr0265	11	14				2
16	spr0407		9	10			2
17	spr0472		20			13	2
18	spr0998		11	16			2
19	spr1097				4	4	2
20	spr1610	17				18	2
21	spr1645		1	2			2
22	spr1771		17	4			2
23	spr1954		12	12			2
24	spr0144	3					1
25	spr0152				10		1
26	spr0219				2		1
27	spr0278				8		1
28	spr0371	1					1
29	spr0425				13		1
30	spr0532					8	1
31	spr0551					10	1

32	spr0601				16		1
33	spr0602			14			1
34	spr0621					9	1
35	spr0634				6		1
36	spr0785				12		1
37	spr0791	16					1
38	spr1359	12					1
39	spr1366				3		1
40	spr1382					16	1
41	spr1408			17			1
42	spr1419				15		1
43	spr1483	13					1
44	spr1494	8					1
45	spr1635	18					1
46	spr1711	19					1
47	spr1761			18			1
48	spr1763	20					1
49	spr1765	14					1
50	spr1770				9		1
51	spr1773				17		1
52	spr1785				7		1
53	spr1833	15					1
54	spr1839	9					1
55	spr1874	5					1
56	spr1919					19	1
57	spr1970		13				1
58	spr1992	2					1
59	spr2003			11			1
60	spr2010	4					1

Tabelle 4.5 (Liste 2): Liste aller durch das TargetRNA-Program ermittelten Zielgene. Die 60 Zielgene sind im Spalte 2 aufgelistet. In den Spalten 3-7 ist der Score der einzelnen Zielgene aus Liste 1 in der entsprechenden csRNA-Spalte eingetragen. In der Spalte 8 ist die Häufigkeit der einzelnen Gene als Zielgene dargestellt.

Im nächsten Schritt wurden die Interaktionsregionen der Zielgene auf der Ebene der Basensequenz einzeln angeschaut und untersucht. Um diese Region klar definieren zu können, wurde ein weiteres Kriterium angelegt. Die Komplementarität sollte sich in der Translationsinitiationsregion befinden. Interne Komplementaritäten in Open Reading Frames wurden hierbei nicht berücksichtigt. Ebenso wurden komplementäre Sequenzen weiter stromaufwärts von der Translationsinitiationsregion bei weiteren Analysen nicht mit einbezogen. Die Gene, welche unter Anwendung dieser Kriterien untersucht wurden, können in zwei Gruppen eingeteilt werden. In die erste Gruppe zählen solche Gene, welche mindestens bei 2 csRNAs als Zielgene vorkommen; hierzu gehören 23 Gene. In der

zweiten Gruppe wurden Zielgene aufgenommen, welche nur bei einer csRNA als Zielgen vorkommen, sich dafür aber unter den ersten 5 Zielgenen befanden. 6 Gene gehörten zu dieser Gruppe.

Anschließend wurde die freie negative Energie (ΔG) für die Interaktionskomplexe zwischen einem Zielgen und allen 5 csRNAs mit Hilfe des 2-state-hybridisation servers auf der Homepage <http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu/twostate.php> berechnet (Zuker, 2003). Alle Zielgene deren Interaktion mit mindestens einer csRNA eine niedrigere negative Energie als -18 hatten, wurden in der Liste 3 aufgenommen (Tabelle 4.6). Die Interaktionskomplexe von 11 untersuchten Genen entsprachen mit drei oder mehr csRNAs diesem Mindestkriterium. Bei 4 Genen konnten jeweils mit einer csRNA Interaktionskomplexe mit niedrigerer freier Energie als -18 kcal/mol berechnet werden.

Nr	Gen	ΔG kcal/mol csRNA1	ΔG kcal/mol csRNA2	ΔG kcal/mol csRNA3	ΔG kcal/mol csRNA4	ΔG kcal/mol csRNA5
1	spr1610	-21,8	-20,9	-20,6	-20,6	-21,8
2	spr2043	-19,6	-21,3	-21,3	-21,3	-21,3
3	spr0081		-22,0	-21,3	-25,7	-22
4	spr0127	-19	-22,1	-21,7		-21,8
5	spr0231		-20,6	-22,6	-18,4	-24,5
6	spr0472		-20,3	-18,9	-21,1	-22,1
7	spr0822		-25,1	-25,2	-20,7	18,6
8	spr1932		-25,5	-24,1	-21,8	-25
9	spr0265	-22,8	-21	-21		
10	spr1645		-22,3	-22,4		-19
11	spr1927		-21,5	-21		-18,8
12	spr0371	-19,3				
13	spr0144	-22,5				
14	spr0559					-20
15	spr1992	-23,7				

Tabelle 4.6 (Liste 3): Gene, deren Interaktionskomplex mit mindestens einer csRNA eine niedrigere freie negative Energie als -18 kcal/mol freisetzt. 15 Gene sind aufgelistet. 11 Gene bilden mit mindestens 3 csRNAs stabile Interaktionskomplexe mit einer niedrigeren freien Energie als -18 kcal/mol. Vier Gene entsprechen diesem Kriterium mit nur einer csRNA.

Während der *in silico*-Identifizierung der Zielgene mit TargetRNA wurde ein weiteres Programm zur Identifizierung von sRNA-Zielgenen veröffentlicht (Mandin *et al.*, 2007). Dieses Programm sucht eine Region von jeweils 200 bp um das Startcodon jedes Open Reading Frames in der Genomsequenz eines Organismus nach möglichen komplementären Sequenzen zu einer bestimmten sRNA-Sequenz ab. Dabei berücksichtigt es interne Loops und Ausbeulungen in den Interaktionsregionen. Mit Hilfe dieses Programms, im weiteren **Methode 2** genannt, wurden in Kooperation mit dem NanoBio-Center an der TU Kaiserslautern weitere Zielgenlisten erstellt. Hierbei wurden zwei verschiedene Analysen durchgeführt. In der ersten Analyse wurde die ungepaarte Region zwischen den 2 Stämmen der csRNAs, wie auch bei TargetRNA, verwendet. Hierbei wurden hauptsächlich Übereinstimmungen mit den TargetRNA-Ergebnissen gefunden. Die abweichenden Gene wurden nach der oben beschriebenen

Vorgehensweise analysiert. Keines dieser Gene entsprach den oben beschriebenen Kriterien, womit die Zielgenliste (Liste 3) nicht mehr erweitert wurde. In der zweiten Analyse wurden die ganzen csRNAs, mit Ausnahme ihrer Terminatorstrukturen, als Eingabe bei der Suche verwendet. Es wurden ebenfalls viele Übereinstimmungen mit den beiden anderen Listen festgestellt. Nach der Analyse der abweichenden Gene wurde spr0791 in die Zielgenliste aufgenommen. Dieses Gen bildet stabile Interaktionskomplexe jeweils mit einem Teil der csRNA-Stämme und der mittleren ungepaarten Region. Somit öffnet sich theoretisch der erste Stamm der csRNAs und ist an der Regulation beteiligt. Dieses Gen sollte einerseits als Kontrolle für die angelegten Kriterien dienen, andererseits kann es als Vorreiter weiterer Zielgensuchen mit veränderten Ausgangskriterien angesehen werden.

Nr	Gen	ΔG kcal/mol csRNA1	ΔG kcal/mol csRNA2	ΔG kcal/mol csRNA3	ΔG kcal/mol csRNA4	ΔG kcal/mol csRNA5
1	spr0791	-30,6	-27,9	-26,9	-28,2	22,8

Tabelle 4.7 (Erweiterung Liste 3): Freie negative Energie der Interaktionskomplexe des Gens spr0791 mit den csRNAs.

Eine weitere Zielgenliste für die csRNAs wurde durch das Interdisziplinäre Zentrum für Bioinformatik an der Universität Leipzig in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stadler ermittelt. Hier wurde das Program RNAup entwickelt und für die Suche verwendet. Im weiteren wird diese Analyse als **Methode 3** beschrieben. Im Gegensatz zu den anderen Programmen werden hier die Sekundärstrukturen der beiden interagierenden RNA-Moleküle in die Berechnungen mit einbezogen (Tafer und Hofacker, 2008). Diese Liste wurde mit den anderen Listen verglichen. Hierdurch konnten neue, zuvor nicht gefundene putative Zielgene aufgenommen werden, deren Interaktionskomplexe jedoch recht niedrige freie Energien aufwiesen. Das einzige Gen, welches allen unseren Kriterien entsprach war das *comA*-Gen, welches theoretisch mit allen 5 csRNAs die thermodynamisch stabilsten Interaktionskomplexe eingehen sollte. Das *comA*-Gen ist maßgeblich an der genetischen Kompetenz von *S. pneumoniae* beteiligt. Der Stamm mit fehlenden csRNAs weist, wie bereits beschrieben, einen veränderten Kompetenz-Phänotyp auf. Aus diesem Grunde wurde für die weiteren Analysen das *comA*-Gen mit einbezogen.

Nr	Gen	ΔG kcal/mol csRNA1	ΔG kcal/mol csRNA2	ΔG kcal/mol csRNA3	ΔG kcal/mol csRNA4	ΔG kcal/mol csRNA5
1	spr0043	-20,7	-19,1	-20,7	-18,8	-21,5

Tabelle 4.8 (Erweiterung Liste 3): Freie negative Energie der Interaktionskomplexe von spr0043 (*comA*) mit den csRNAs

Die Regulation der *in silico* ermittelten Zielgene sollte im nächsten Schritt *in vivo* untersucht werden. Die 11 Gene aus der Vorhersage mit Methode 1, ein Gen aus der Vorhersage mit der Methode 2 und ein Gen aus Vorhersage mit Methode 3 wurden näher bezüglich ihrer Organisation im Genom analysiert. Die gesamte Region im Genom um diese Gene herum wurde untersucht. Es wurde

überprüft, ob diese Gene in Operons organisiert sind. Sollten mögliche Operonstrukturen vorliegen, wurden die Gene des Operons ermittelt und auch die Position des Zielgens im Operon. Diese Informationen wurden in der Tabelle 4.9, Spalte 3 eingetragen. Falls die Zielgene nicht die ersten Gene in den Operons waren, wurde eine mögliche Translationsüberlappung untersucht. Falls keine Überlappung der Translation vorlag, wurde die Länge der Intergenregion bestimmt. Diese Informationen sind in der Spalte 4 vermerkt. Zudem wurden Informationen zur Funktion der Gene ermittelt.

Nr.	Spr	Gen	Gen im Operon	Transl. Überl.	Methode	Genfunktion
1	spr0043	<i>comA</i>	1(2)		3	ABC-Exporter, Substrat:CSP
2	spr0791	<i>hsdS</i>	2(3)	nein(12)	2	Type I Restriktions- und Modifikationsprotein
3	spr1610		2 (3)	nein(18)	1+2	Membranprotein, besitzt homologe Domäne zu M50 Peptidasen
4	spr2043	<i>comC</i>	1 (3)		1+2	Kompetenz-Pheromon CSP
5	spr0081		1(4)		1+2	Membranprotein, Permease eines ABC-Transporters
6	spr0127	<i>cibB</i>	2 (4)	nein (1)	1	Putatives Bakteriocin
7	spr0231		3 (3)	nein 16)	1	EIIC Komponente eines Phosphotransferase Systems
8	spr0472	<i>blpY</i>	2(3)	nein(33)	1+2	Putatives Bakteriocin
9	spr0822		4 (5)	ja	1 +2	Unbekannt, gehört zur Familie der Peptidyl-Arginin Deiminasen
10	spr1932		1 (1)		1+2	Membranprotein
11	spr0265		1 (1)		1+2	Unbekannt, gehört anhand ihrer Domänen-struktur zu der Familie der CAAX Proteasen
12	spr1645		2 (2)	nein(25)	1+2	Membranprotein, Substratbindeprotein eines ABC-Transporters
13	spr1927		4 (6)	nein (2)	1	Membranprotein


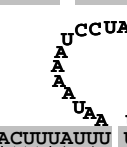
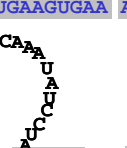
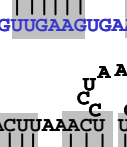
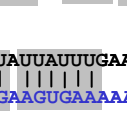
Tabelle 4.9 (Liste 4): 13 zur *in vivo*-Analyse ausgewählte putative Zielgene. In Spalte 3 sind die Gennamen, soweit bekannt, dargestellt. In der Spalte „Gen im Operon“ ist die Position der Zielgene in den Operons und die Anzahl der Gene in den Operons in Klammer dargestellt. In der Spalte 5 ist die Translationsüberlappung, falls sie nicht die ersten Gene des Operons sind, dargestellt. In Klammer ist die Größe der ermittelten Intergenregionen gezeigt. Spalte 6 zeigt die Identifizierungsmethode der Zielgene und in der Spalte 7 wird die Funktion der Gene, soweit bekannt, gezeigt.

Die Interaktionskomplexe der oben aufgelisteten 13 Zielgene und der csRNAs wurden, wie bereits erwähnt, mit Hilfe des 2-state-hybridisation Servers auf <http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu/twostate.php> erstellt (Zuker, 2003). Die Interaktionskomplexe der Zielgen-mRNAs und der kleinen RNAs werden im Folgenden vorgestellt. Hierbei ist jeweils die gesamte Basensequenz der ungepaarten Region der jeweiligen kleinen RNA mit der hierzu komplementären bzw. gegenüberliegenden Sequenz der Zielgen-mRNAs dargestellt. Lediglich im Falle von *hsdS* scheinen auch die ersten stem loop-Strukturen an der Bildung der Interaktionskomplexe beteiligt und sind somit auch dargestellt.

Interaktionsregion der *comA*-mRNA mit den csRNAs

csRNA1/<i>comA</i> $\Delta G = -20,7$ kcal/mol	5' AAAAUCCUAAACUUU — UUUCAUC — ACAAUCUCCUAAU 3' 3' GCAAAGGGUUUAAAGUAUAAGUAGAGGAAGGGGAUU 5'
csRNA2/<i>comA</i> $\Delta G = -19,1$ kcal/mol	5' AAAAUCCUAAACUUUUCUUUUUCAUAAUAAUCUCCCUAA 3' 3' GCAAAGGGUUU — AAAGUAUAAGUAGAGGAAGGGGAUU 5'
csRNA3/<i>comA</i> $\Delta G = -20,7$ kcal/mol	5' AAAUAUCCUAAACUUUUCUUUUUCAUAAUAAUCUCCCUAU 3' 3' UGCAAAGGGUUU — AAAGUAUAAGUAGAGGAAGGGGAUU 5'
csRNA2/<i>comA</i> $\Delta G = -18,8$ kcal/mol	5' AACUCCUAAACUUUUUCAUAAUAAUCUCCCUAU 3' 3' CAAAGGGUUU — AAAGUAUAAGUAGAGGAAAA 5'
csRNA5/<i>comA</i> $\Delta G = -21,5$ kcal/mol	5' UGAACUCCUAAACUUUUUCAUAAUAAUCUCCCUUC 3' 3' UGCAAAGGGUUU — AAAGUAUAAGUAGAGGAAA 5'

Interaktionsregion der *hsdS*-mRNA mit den csRNAs

csRNA1/<i>hsdS</i> $\Delta G = -30,6$ kcal/mol	 5' AAGAC — CUCCUAAACUUU ACUUUUUUCAU — CACA — AUCUC — CUA 3' 3' UUCUGAAGGGGUUGAAG — UGAAAAAAGUAUGUCGGUGGAGAGAU 5'
csRNA2/<i>hsdS</i> $\Delta G = -27,9$ kcal/mol	 5' AAGAC — CUCCUAAACUUUAUUU UUUUCAUAA — UAAUCUCCCUU 3' 3' UUCUGAAGGGGUUGAAGUGAA AAAAGUAUGUCGGUGG — AGAGAU 5'
csRNA3/<i>hsdS</i> $\Delta G = -25,7$ kcal/mol	 5' GAAGACCUCU — AACUUUUC — UUUUUCAUAAUA — AUCUCCCUAU 3' 3' AUUCUGAAGGGGUUGAAGUGAAAAAAGUAUGUCGGUGGAGAGAUG 5'
csRNA4/<i>hsdS</i> $\Delta G = -28,2$ kcal/mol	 5' UAAGAAGA — CCUUAACUUUAAACU UUUUUCAUAAUA — AUCUCCCUAU 3' 3' AUUCUGAAGGGGUUGAAGUGAA AAAAAGUAUGUCGGUGGAGAGAUG 5'
csRNA5/<i>hsdS</i> $\Delta G = -22,8$ kcal/mol	 5' AAAGAC — CUCCUAAUAAUUAUUGAA — ACAGUAACACUGAAUUAU 3' 3' AUUCUGAAGGGGUUGAAGUGAAAAAAGUAUGUCG — GUGGAGAGAUGA 5'

Interaktionsregion der *spr1610*-mRNA mit den csRNAs

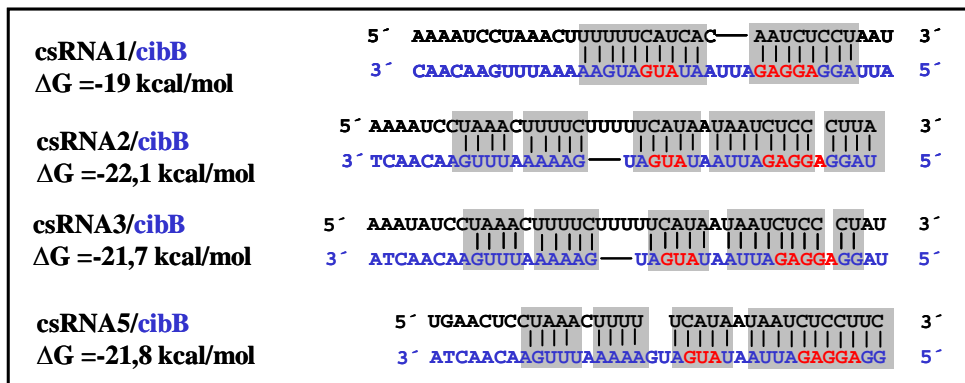
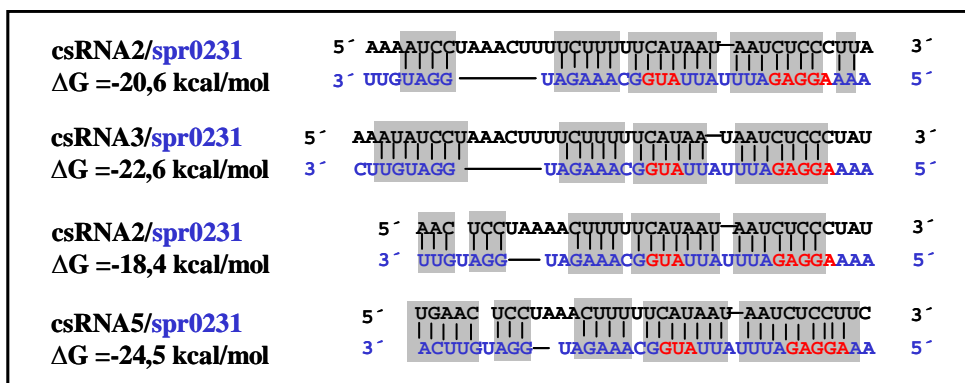
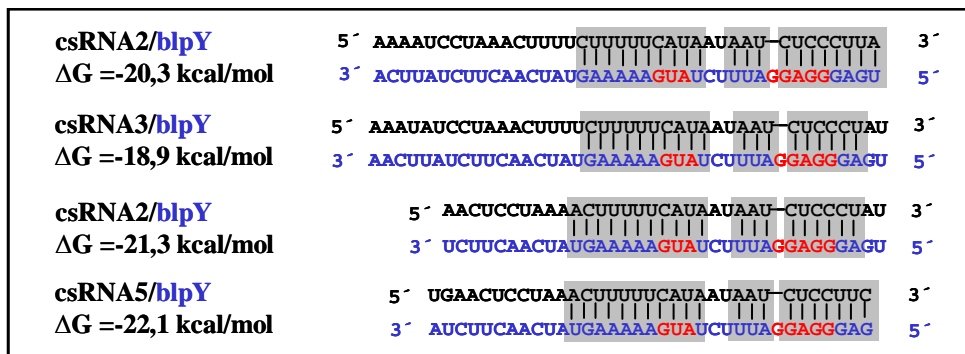
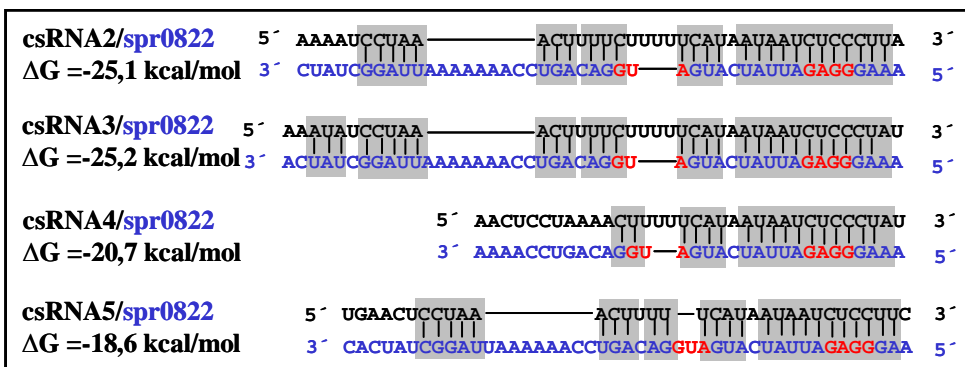
csRNA1/<i>spr1610</i> $\Delta G = -21,4$ kcal/mol	5' AAAAUCCUAAACUUUUUCAUCACAAUCUCCUAAU 3' 3' AUUCAGGGUU-AAAAGAA GT AUUGU-GGAGGUUGG 5'
csRNA2/<i>spr1610</i> $\Delta G = -20,9$ kcal/mol	5' AAAAUCCUAAACUUUUUCAUAAUAAUCUCCCUUA 3' 3' AUUCAGGGUU-AAAAGA- AGTA UUGU-GGAGGUUGG 5'
csRNA3/<i>spr1610</i> $\Delta G = -20,6$ kcal/mol	5' AAAUAUCCUAAACUUUUUCAUAAUAAUCUCCCUAU 3' 3' AUUCAGGGUU-AAAAGA- AGTA UUGU-GGAGGUUGG 5'
csRNA2/<i>spr1610</i> $\Delta G = -20,6$ kcal/mol	5' AACUCCUAAAACUUUUUCAUAAUAAUCUCCCUAU 3' 3' UUCAGGGUU-AAAAGAA GT AUUGU-GGAGGUUGG 5'
csRNA5/<i>spr1610</i> $\Delta G = -21,8$ kcal/mol	5' UGAACUCCUAAACUUUUUCAUAAUAAUCUCCUUC 3' 3' UAUCAGGGUUA AAAAGAA GT AUUGU-GGAGGUUGG 5'

Interaktionsregion der *comC*-mRNA mit den csRNAs

csRNA1/<i>comC</i> $\Delta G = -19,6$ kcal/mol	5' UAAAA - UCCUA - AACU - UUUUUCAUAC - AAUCUCCUAAUG 3' 3' GUUUGACAAGGUUAAAUGACACAAAA GUA UUAUUUAAGAGGAUUU 5'
csRNA2/<i>comC</i> $\Delta G = -21,3$ kcal/mol	5' AAAAUCCUAAACUUUUCU - UUUUCAUAAUA - AUCUCCCUUA 3' 3' UUUCGAUGUUUGACAAGG AAAA GUA UUAUUUAAGAGGAUUU 5'
csRNA3/<i>comC</i> $\Delta G = -21,3$ kcal/mol	5' AAAUAUCCUAAACUUUUCU - UUUUCAUAAUA - AUCUCCCUAU 3' 3' GUUUCGAUGUUUGACAAGG AAAA GUA UUAUUUAAGAGGAUUU 5'
csRNA4/<i>comC</i> $\Delta G = -21,3$ kcal/mol	5' AACUCCUAA - AACU - UUUUCAUAAUA - AUCUCCCUAU 3' 3' ACAAGGUUAAAUGACACAAAA GUA UUAUUUAAGAGGAUUU 5'
csRNA5/<i>comC</i> $\Delta G = -21,3$ kcal/mol	5' UGAAC - UCCU - AAACU - UUUUCAUAAUA - AUCUCCUUC 3' 3' GUUUGACAAGGUUAAAUGACACAAAA GUA UUAUUUAAGAGGAUU 5'

Interaktionsregion der *spr0081*-mRNA mit den csRNAs

csRNA2/<i>spr0081</i> $\Delta G = -22,2$ kcal/mol	5' AAAAUCCUAAACUUUUCUUUUUCAUAAUAAUCUCCCUUA 3' 3' AGTTACAAAAACUUUUGAAAA GUA UUAAGGAGGGAAA 5'
csRNA3/<i>spr0081</i> $\Delta G = -21,3$ kcal/mol	5' AAAUAUCCUAAACUUUUCUUUUUCAUAAUAAUCUCCCUAU 3' 3' AGTTACAAAAACUUUUGAAAA GUA UUAAGGAGGGAAA 5'
csRNA4/<i>spr0081</i> $\Delta G = -25,7$ kcal/mol	5' AACUCCUAAAACUUUUUCAUAAUAAUCUCCCUAU 3' 3' CAAAAACUUUUGAAAA GUA UUAAGGAGGGAAA 5'
csRNA5/<i>spr0081</i> $\Delta G = -22$ kcal/mol	5' UGAACUCCUAAACUUUUUCAUAAUAAUCUCCUUC 3' 3' AAAAAACUUUUGAAAA GUA UUAAGGAGGGAA 5'

Interaktionsregion der *cibB*-mRNA mit den csRNAsInteraktionsregion der *spr0231*-mRNA mit den csRNAsInteraktionsregion der *blpY*-mRNA mit den csRNAsInteraktionsregion der *spr0081*-mRNA mit den csRNAs

Interaktionsregion der spr1932-mRNA mit den csRNAs

csRNA2/spr1932 $\Delta G = -25,5$ kcal/mol	5' AAAAUCUAAACUUUUUUUUUCAUA-AUAAUCUCCCUUA 3' 3' CCTAAAGAUUUGTTAUC-AAAGUAUCUAUUAAGGGGAGG 5'
csRNA3/spr1932 $\Delta G = -24,1$ kcal/mol	5' AAAUAUCCUAAACUUUUUUUUUCAUA-AUAAUCUCCCUAU 3' 3' UCCTAAAGAUUUGTTAUC-AAAGUAUCUAUUAAGGGGAGG 5'
csRNA4/spr1932 $\Delta G = -21,8$ kcal/mol	5' AACUCCUAAACUUUUUUUCAUA-AUAAUCUCCCUAU 3' 3' AUUUGTTAUC-AAAGUAUCUAUUAAGGGGAGG 5'
csRNA5/spr1932 $\Delta G = -25$ kcal/mol	5' UGAACUCCUAAAG-UUUUUUCAUA-AUAAUCUCCCUUC 3' 3' UCCTAAAGAUUUGTTAUCAAAGUAUCUAUUAAGGGGAGG 5'

Interaktionsregion der spr0265-mRNA mit den csRNAs

csRNA1/spr0265 $\Delta G = -22,8$ kcal/mol	5' AAAAUCUAAACUUUUUUUCAUCAC-AAUCUCCUAAU 3' 3' GGUGUAUAAAAAGAGAAAGUAGUGGAUAAGAGGACAU 5'
csRNA2/spr0265 $\Delta G = -21$ kcal/mol	5' AAAAUCUAAACUUUUUUUUUCAUAAU-AAUCUCCCUUA 3' 3' GAAAGGUGUAUAAAAAGAGAAAGUAGUGGAUAAGAGGACAU 5'
csRNA3/spr0265 $\Delta G = -21$ kcal/mol	5' AAAUAUCCUAAACUUUUUUUUCAUAAU-AUCUCCCUAU 3' 3' AGAAAGGUGUAUAAAAAGAGAAAGUAGUGGAUAAGAGGACAU 5'

Interaktionsregion der spr1645-mRNA mit den csRNAs

csRNA2/spr1645 $\Delta G = -22,4$ kcal/mol	5' AAAAUCUAAACUUUUU-CUUUUUCAUAAUAA-UCUCCCUUA 3' 3' UCAUCUGGUUUGAAAGUAAAAAAGUAUAUUCAGAGGAAAA 5'
csRNA3/spr1645 $\Delta G = -22,3$ kcal/mol	5' AAAUAUCCUAAACUUUUU-CUUUUUCAUAAUAA-UCUCCCUAU 3' 3' GUCAUCUGGUUUGAAAGUAAAAAAGUAUAUUCAGAGGAAAA 5'
csRNA5/spr1645 $\Delta G = -19$ kcal/mol	5' UGAACUCCUAAACUUUU-UCAUAAUAA-UCUCCCUUC 3' 3' GUCAUCUGGUUUGAAAGUAAAAAAGUAUAUUCAGAGGAAAA 5'

Interaktionsregion der spr1927-mRNA mit den csRNAs

csRNA2/spr1927 $\Delta G = -21,5$ kcal/mol	5' AAAAUCUAAACUUUUUUUUUCAUA-AUAAUCUCCCUUA 3' 3' UGUUAG-AUGCAAAGAAAAAGUAUAAGUAAAGAGGAAAA 5'
csRNA3/spr1927 $\Delta G = -21$ kcal/mol	5' AAAUAUCCUAAACUUUUUUUUUCAUA-AUAAUCUCCCUAU 3' 3' AAUUUGUUAGAUGCAGAAAGAAAAAGUAUAAGUAAAGAGGAAAA 5'
csRNA5/spr1927 $\Delta G = -18,8$ kcal/mol	5' UGAACU-CCUAA-ACUUUUUCAUA-AUAAUCUCCCUUC 3' 3' AUUUGUUAGAUGCAGAAAGAAAAAGUAUAAGUAAAGAGGAAAA 5'

Abbildung 4.26: Interaktionskomplexe der Zielgen-mRNAs mit den csRNAs. Die Interaktionskomplexe wurden *in silico* mit dem 2-state-hybridisation-server (Zuker, 2003) ermittelt. Schwarz dargestellt sind die Basen der mittleren ungepaarten Regionen der csRNAs in 5'-3'-Richtung. Blau dargestellt sind die interagierenden mRNA-Teile der Zielgene in 3'-5'-Richtung. Rot sind die Translationsinitiationsregionen der Zielgene dargestellt. Die komplementären Sequenzregionen wurden grau hinterlegt. Die freie negative Energie ΔG der Interaktionskomplexe wurde in kcal/mol auf der linken Seite angegeben.

4.7 Untersuchung der csRNA-vermittelten posttranskriptionellen Regulation der *in silico* ermittelten putativen Zielgene

Die durch die csRNAs vermittelte posttranskriptionelle Regulation der zuvor aufgelisteten 13 putativen Zielgene sollte *in vivo* untersucht werden. Hierzu konnte theoretisch das Translations Probe Plasmid pTP2 verwendet werden (Kovács *et al.*, 2006). Dieses Plasmid ist ein Derivat von pBR322. Es ist dementsprechend replikativ in *E. coli*. Eine Selektion in *E. coli* wird durch das Ampicillinresistenzgen (*bla*) ermöglicht. In *S. pneumoniae* integriert das Plasmid am *bgaA-gatC*-Locus, wodurch die endogene β -Galaktosidase zerstört wird. Die Selektion des integrativen Plasmids erfolgt in *S. pneumoniae* auf Tetracyclin (*tetM*). Bei diesem Plasmid werden die Promotorregionen der zu untersuchenden Gene inklusive der ersten Codons vor das Promotor-lose und Translations-initiationssignal-lose *lacZ* kloniert. Somit wird die Expression von LacZ unter die Kontrolle des klonierten Genfragments gestellt. Bei der Durchführung dieser Strategie würden in diesem Fall einige Probleme entstehen. Das erste Problem besteht darin, dass über die meisten hier zu untersuchenden Gene keine Angaben über ihre Promotoren bekannt sind, wodurch keine genaue Klonierung durchgeführt werden kann. Zweitens sind einige der Gene in Operonen organisiert und die Gene von Interesse befinden sich nicht an der ersten Stelle des Operons. Dadurch müssten alle vor dem zu untersuchenden Gen liegenden Gene mit kloniert werden. Drittens ist nicht auszuschließen, dass unbekannte Regulatoren die Promotoren der Gene regulieren. Zudem ist die Expression der Gene unter den angewendeten Bedingungen unbekannt.

4.7.1 Konstruktion des Testvektors pTP3

Um die oben erwähnten Schwierigkeiten zu umgehen, wurde, ausgehend vom oben beschriebenen Vektor pTP2, ein neuer Vektor pTP3 konstruiert. Hierbei wurde ein neu konstruierter Promotor P_{vegT} , welcher konstitutiv und unabhängig von CiaR exprimiert wird, vor das Promotor-lose *lacZ* integriert. Diese Konstruktion erlaubt die Klonierung der 5'-Regionen von Genen inklusive der ersten Codons *in frame* vor *lacZ*. Dadurch wird die Expression des *gen'*-*lacZ* unter die Kontrolle des *vegT*-Promotors gestellt. Die konstitutive und CiaRH-unabhängige Expression durch diesen Promotor ermöglicht die Untersuchung der posttranskriptionellen Regulation der klonierten Gene durch Einführen des Konstrukts in verschiedene csRNA-Inaktivierungsstämme.

Der zweite Vorteil dieses Konstrukts besteht darin, dass die posttranskriptionelle Regulation der Gene, deren +1 unbekannt ist, ebenfalls untersucht werden kann. Hierzu kann ein Fragment, welches einige bp stromaufwärts beginnt und einige Codons stromabwärts der vorhergesagten RNA/RNA-Interaktionsregion des zu untersuchenden Gens endet, vor das *lacZ* kloniert werden. Es entsteht folglich bei der Transkription ausgehend von P_{vegT} das 5'-Ende der mRNA nicht in voller Länge,

wobei jedoch die Auswirkung der vorhergesagten Interaktion auf die Expression des Zielgen- β -lacZ-Fusionsproteins untersucht werden kann.

Bei der Konstruktion des neuen Vektors wurde, wie oben beschrieben, ein Promotor vor das β -lacZ vorgeschaltet um die konstitutive Expression der klonierten Gene gewährleisten zu können. Der hierbei verwendete Promotor musste drei entscheidende Eigenschaften haben. Einerseits sollte er in *S. pneumoniae* R6 eine Aktivität aufweisen und andererseits sollte seine Aktivität nicht von CiaRH beeinflusst werden. Zudem sollte eine Schnittstelle derart stromabwärts der -10-Region vorhanden sein, daß nach der Klonierung eines Fragments der Transkriptionsstartpunkt mit der ersten Base des klonierten Fragments übereinstimmt.

Zwei bekannte Promotoren kamen bei dieser Konstruktion in Frage. Der erste Promotor P_{vegII} stammt aus *Bacillus subtilis*. Die Expressionsstärke liegt in *S. pneumoniae* R6 bei 12 β -Galaktosidase-Units (Halfmann *et al*, 2007a). Der zweite Promotor P_{vegW} ist zu P_{vegII} bis auf eine Base identisch. Durch Deletion eines Guanins zwischen der -35- und -10-Region wurde dieser Abstand verkürzt, wodurch der Promotor eine Aktivität von 129 Units in *S. pneumoniae* R6 zeigt (Halfmann, Doktorarbeit). Diese beiden Promotoren werden unabhängig von CiaR exprimiert.

Als Schnittstelle wurde die Sequenz des *PmeI*-Restriktionsenzym ausgewählt. Die Erkennungssequenz des Enzyms ist GTTTAAAC. Bei der Restriktion entstehen glatte Enden nach GTTT. Die *PmeI*-Sequenz wurde stromabwärts der -10-Regionen von P_{vegII} und P_{vegW} so angehängt, dass sich die Transkriptionsstartpunkte beider Promotoren an der ersten Base nach der GTTT-Sequenz befinden. Stromabwärts der *PmeI*-Schnittstelle wurde zusätzlich eine *BamHI*-Schnittstelle angehängt um *PmeI* / *BamHI*-Klonierungen der Zielgenfragmente zu ermöglichen. Die Sequenzen beider Promotoren sind in Abbildung 4.27 dargestellt.

P_{vegII} mit *PmeI*-Anhang

GCATGC -186 bp- TTTTATTGACAACGTCTTATTAACGTTGATATAATTTGTTTAAACGTACGTACGGATCC
SphI -35 -10 +1 *PmeI* *BamHI*
 -18-

P_{vegW} mit *PmeI*-Anhang

GCATGC -186 bp- TTTTATTGACAACGTCTTATTAAC-TTGATATAATTTGTTTAAACGTACGTACGGATCC
SphI -35 -10 +1 *PmeI* *BamHI*
 -17-

Abbildung 4.27: Basensequenz von P_{vegII} und P_{vegW} mit angehängten *PmeI*-Schnittstellen. Die -35- und -10-Regionen der Promotoren sind grau unterlegt. Die Abstände zwischen -35 und -10 sind jeweils eingezeichnet. Die *PmeI*-Schnittstelle ist rot dargestellt. Die Transkriptionsstartpunkte der Promotoren sind fett gedruckt. Die flankierenden *BamHI*- und *SphI*-Schnittstellen sind grün bzw. gelb unterlegt.

In einem nächsten Schritt wurde die Expression der beiden Promotoren untersucht. Dazu wurden die Promotorfragmente mit *SphI* und *BamHI* verdaut und in das Pneumo Promotor Probe Plasmid pPP2 (Halfmann *et al.*, 2007a) integriert. Dieses Plasmid besitzt ein komplettes *lacZ*-Gen mit vollständigen Translationsinitiationssignalen. Durch Integration eines Promotors an den stromaufwärts von *lacZ* lokalisierten *SphI* und *BamHI*-Schnittstellen wird die Expression der β -Galaktosidase unter die Kontrolle des klonierten Promotors gestellt. Somit kann durch Messung der β -Galaktosidaseaktivität die Promotorstärke bestimmt werden.

Bei P_{vegII} mit *PmeI*-Anhang wurden lediglich 5 β -Galaktosidase-Units gemessen. Bei P_{vegW} mit *PmeI*-Anhang konnten dagegen 600 β -Galaktosidase-Units gemessen werden. Im Hinblick auf die starke Expression der csRNAs mit Promotoraktivitäten von bis zu mehr als 1000 Units (Halfmann *et al.*, 2007) schien dieser stärkere Promotor besser geeignet für die Anwendung bei den hier durchzuführenden Untersuchungen.

P_{vegW} mit *PmeI*-Anhang wurde P_{vegT} benannt und vor das Promotor-lose *lacZ* in pTP2 integriert. Das neu konstruierte Plasmid wurde pTP3 genannt. Die Konstruktion von pTP3 ist in Abschnitt 3.7.3 beschrieben.

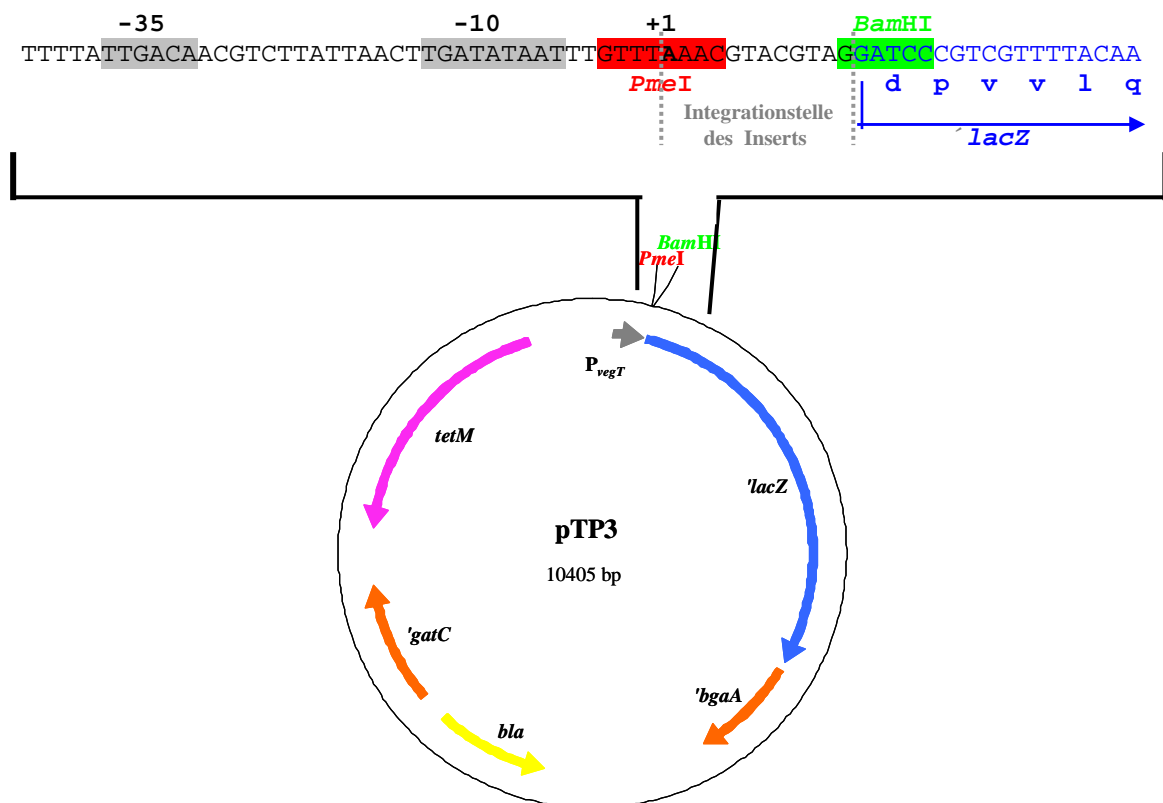


Abbildung 4.28: Genkarte des integrativen pTP3-Plasmids. Der Nukleotidsequenz des für die Klonierung wichtigen Bereichs ist gezeigt. Die -35- und -10-Region des Promotors P_{vegT} sind grau unterlegt. Die ersten Nukleotide und Aminosäuren des Translationsinitiationslosen und Startcodonlosen *lacZ* sind blau gedruckt. Um translationelle Fusionen zu erzeugen, werden die *PmeI*-Schnittstelle (rot) und die *BamHI*-Schnittstelle (grün) verwendet. Das +1 des Promotors ist eingezeichnet und stimmt mit der ersten klonierten Base überein. Die Selektion erfolgt in *E. coli* mit Ampicillin (*bla*) und X-Gal, in *S. pneumoniae* mit Tetracyclin (*tetM*). *bgaA* und *gatC*: Fragmente zur Integration am *bgaA-gatC*-Locus in *S. pneumoniae* mittels homologer Rekombination.

Im Folgenden soll die Funktionsweise dieses Plasmids kurz erläutert werden. Ein Verdau mit dem Enzym *PmeI* führt zu einem glatten Ende nach der Basensequenz GTTT. Als weitere Schnittstelle für die Klonierung steht die *BamHI*-Schnittstelle zur Verfügung. Diese Schnittstelle befindet sich am 5'-Ende des Reportergens *lacZ* und erlaubt die *in frame* Herstellung von Zielgen'-*lacZ*-Fusionsproteinen, da das *lacZ*-Gen keine Translationsinitiationssignale und kein Startcodon besitzt. Unter Verwendung dieser beiden Schnittstellen kann hier ein Fragment mit glatten phosphorylierten Enden und mit *BamHI*-Schnittstellen kloniert werden.

Die Transkription von P_{vegT} startet bei dieser Klonierung an der ersten Base des klonierten Fragments. Durch die blunt end-Klonierung an der *PmeI*-Schnittstelle enthält die mRNA an ihrem 5'-Ende keine störenden zusätzlichen Basen. Die RNA-Polymerase startet an der ersten Base des klonierten Fragments. Damit ist die Wechselwirkung der csRNAs und der mRNA originalgetreu gewährleistet.

4.7.2 Klonierung der 13 Zielgensequenzen in pTP3

Die interagierenden Abschnitte der mRNA der 13 Zielgene wurden an den Schnittstellen *PmeI* und *BamHI* in pTP3 kloniert. Diese Fragmente erstrecken sich entsprechend der vorhergesagten Interaktion von einigen Basen stromaufwärts bis einige Basen stromabwärts des jeweiligen Startcodons. Oft mussten kleine Fragmente von ca. 30 bp kloniert werden. Bei diesen Fragmenten wurde auf eine Amplifikation mittels PCR verzichtet. Stattdessen wurden die Fragmente als komplementäre Oligonukleotide bestellt. An den 3'-Enden der Fragmente wurden die komplementären Basen des *BamHI*-Überhangs (GATC) angehängt. Die beiden komplementären Oligo-Stränge wurden zusammengegeben und phosphoryliert. Danach konnten die Fragmente ohne weitere Verdau mit dem *PmeI*- und *BamHI*-verdauten pTP3 zur Ligation eingesetzt werden.

Bei den Zielgenen *comA* und *comC* waren die Transkriptionsstartpunkte bekannt. Aus diesem Grunde wurden bei diesen Genen die gesamte mRNA-Leadersequenz ab dem bekannten +1 mittels PCR amplifiziert und kloniert.

Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* DH5 α transformiert und auf 100 μ g/ml Ampicillin und 60 μ g/ml X-Gal selektioniert. Die erwünschten Klone wurden mittels Kolonie-PCR identifiziert und sequenziert. Die so entstandenen Plasmide wurden schließlich in den Wildtyp *S. pneumoniae* R6 und den csRNA-Inaktivierungsstamm *S. pneumoniae* RK12345 transformiert. Die Transformanten wurden auf 3 μ g/ml Tetracyclin selektioniert. Die Integration des Plasmids am *bgaA-gatC*-Locus wurde mittels PCR überprüft. Die Fragmente von 12 Zielgenen konnten kloniert werden. Die Klonierung des spr1927-Fragments blieb ohne Erfolg. Deswegen konnte dieses Gen nicht weiter untersucht werden.

Die zu klonierenden Fragmente der 13 Zielgene werden im Folgenden aufgeführt. Hierbei ist jeweils die gesamte klonierte Basensequenz und die ersten paar Nukleotide des *lacZ* gezeigt. Die vorhergesagten interagierenden Bereiche sind unterstrichen und die Shine-Dalgarno-Sequenzen sowie ATG-Startcodons sind fett gedruckt. Die Aminosäuren der entstandenen Fusionsproteine befinden sich in der Zeile unterhalb der entsprechenden Codons. Die Nukleotidsequenz und Aminosäuren des *lacZ*-Gens sind blau gedruckt.

In pTP3 klonierte *comA*-Region

```
+1
ATCAGATGAG TTTATACTCT TCGAAAATCA AATTCAAACC ACGTCAACGT CGCCTTGCCG
TATATATGTG ACTGACTTCG TCAGTCCTAT CTACAACCTC AAAACAGTGT TTTGAGCAGC
CTGCGGCTAG TTTCTAGTGT TGCTCTTTGA TTTTCATTGA GTATTAGGGA AAAGGAGATG
AATATGAAAT TTGGGAAACG TCAGGATCCC GTCGTTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC
      m  k   f   g   k   r   q   d   p   v   v   l   q   r   r   d   w   e   n
>>.....comA'-lacZ'.....>
```

In pTP3 klonierte *hsdS*-Region

```
AAGTAGAGAG GTGGCTGTAT GAAAAAAGTG AAGTTGGGGG AAGTCTTAGA TCCCGTCGTT
      m  k   k   v   k   l   g   e   v   l   d   p   v   v
>>.....hsdS'-lacZ'.....>
```

In pTP3 klonierte *spr1610*-Region

```
TTGGAGGTGT TATGAAGAAA ATTGGGACTT ATGATCCCGT CGTTTTACAA CGTCGTGACT
      m  k   k   i   g   t   y   d   p   v   v   l   q   r   r   d
>>.....spr1610'-lacZ'.....>
```

In pTP3 klonierte *comC*-Region

```
+1
GTAAGTTAGC TTACAAGAAA AAACATTTTA GGAGATTTTA TTATGAAAAA CACAGTTAAA
      m  k   n   t   v   k
>>.comC'-lacZ'...>

TTGGAACAGT TTGTAGCTTT GGATCCCGTC GTTTTACAAC GTCGTGACTG GGAAAACCCT
      l   e   q   f   v   a   l   d   p   v   v   l   q   r   r   d   w   e   n   p
>>.....comC'-lacZ'.....>
```

In pTP3 klonierte *spr0081*-Region

```
AAAAAGGGAG GAAATTATGA AAAAGTTTTC AGATCCCGTC GTTTTACAAC GTCGTGACTG
      m  k   k   f   s   d   p   v   v   l   q   r   r   d
>>.....spr0081'-lacZ'.....>
```


In pTP3 klonierte *cibB*-Region

```

TTAGGAGGAG ATTAATATGA TGAAAAATTT GAACAACGAT CCCGTCGTTT TACAACGTCG
      m   m k n   l n n d p v v l q r
>>.....cibB'-'lacZ'.....>

```

In pTP3 klonierte *spr0231*-Region

```

AAAAGGAGAT TTATTATGGC AAAGATGGAT GTTCAGAAAA TCATTGATCC CGTCGTTTTA
      m   a k m d v q k i i d p v v l
>>.....spr0231'-'lacZ'.....>

```

In pTP3 klonierte *blpY*-Region

```

TGAGGGAGGA TTTCTATGAA AAAGTATGAT CCCGTCGTTT TACAACGTCG TGACTGGGAA
      m   k k y d p v v l q r r d w e
>>.....blpY'-'lacZ'.....>

```

In pTP3 klonierte *spr0822*-Region

```

AGACTTTAAA GGGAGATTAT CATGATGGAC AGTCCAAAAA AATTAGGCTA TGATCCCGTC
      m m d s p k k l q y d p v
>>.....0822'-'lacZ'.....>

```

In pTP3 klonierte *spr1932*-Region

```

TCTTGATGTA GAACTTAGAA CAAGGAGGGA GATTATCTAT GAAACTATTG TTTAGAGATC
      m k l l f r d
>>...spr1932'-'lacZ'...>

```

In pTP3 klonierte *spr0265*-Region

```

AGGAGATAGG TGATGAAAGA GAAAAATGAT CCCGTCGTTT TACAACGTCG TGACTGGGAA
      m k e k n d p v v l q r r d w e
>>.....spr0265'-'lacZ'.....>

```

In pTP3 klonierte *spr1645*-Region

```

AAAAAAGGAG AACTTATCAT GAAAAAATG AAAGTTTGGT CTGATCCCGT CGTTTTACAA
      m k k m k v w s d p v v l q
>>.....spr1645'-'lacZ'.....>

```

In pTP3 klonierte *spr1927*-Region

```

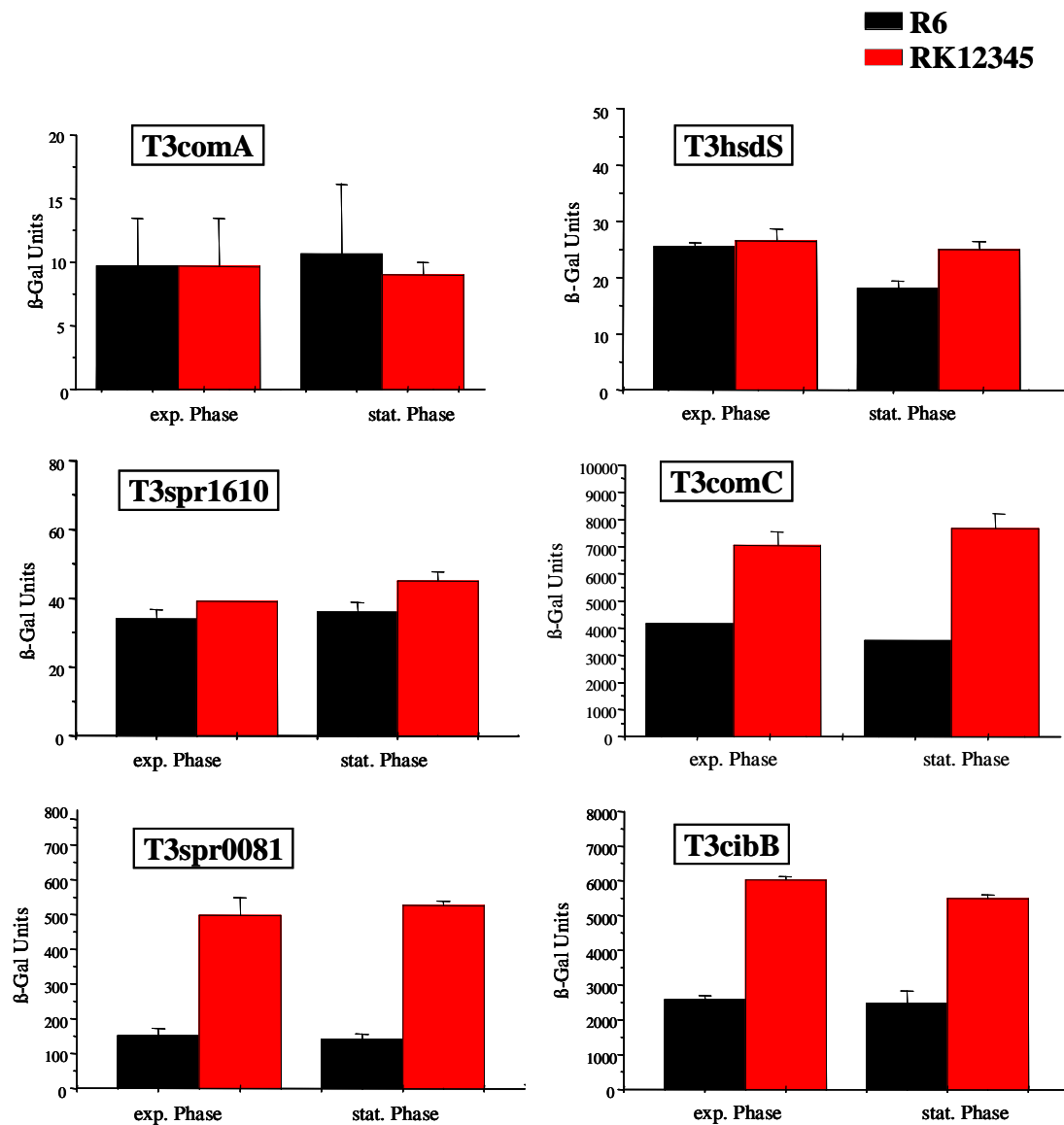
AAAAAAGGAGA ATGAATATGA AAAAGAAACG TAGATTGTTA GATCCCGTCG TTTTACAACG
      m k k k r r l l d p v v l q
>>.....spr1927'-'lacZ'.....>

```

Abbildung 4.29: In das pTP3 klonierte, an *lacZ* fusionierte Zielensequenzen. Die 13 klonierten Sequenzen (schwarz) und die ersten Basen des *lacZ* (blau) sind gezeigt. Die interagierenden Bereiche der Zielensequenzen sind unterstrichen, SD-Sequenzen und ATG sind fett gedruckt. Die ersten Aminosäuren der entstandenen Fusionsproteine sind eingezeichnet.

4.7.3 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität der Zielgen'-LacZ-Fusionsproteine in Abhängigkeit der csRNAs

Die Aktivität der Zielgen'-LacZ-Fusionsproteine in Abhängigkeit der csRNAs wurde mittels β -Galaktosidase-Assays bestimmt. Hierzu wurden die Plasmide jeweils in das Genom des Wildtyps *S. pneumoniae* R6 und der csRNA Mutante *S. pneumoniae* RK12345 eingefügt. Die Messung der β -Galaktosidaseaktivität erfolgte unter Verwendung von Ganzzelllysaten der jeweiligen Stämme. Es wurden Messungen in der mittleren exponentiellen Phase bei einer Zelldichte von Nephelo 80 und kurz nach Eintritt in die stationäre Phase durchgeführt. Die Ergebnisse der Messungen sind in der Abbildung 4.30 dargestellt.



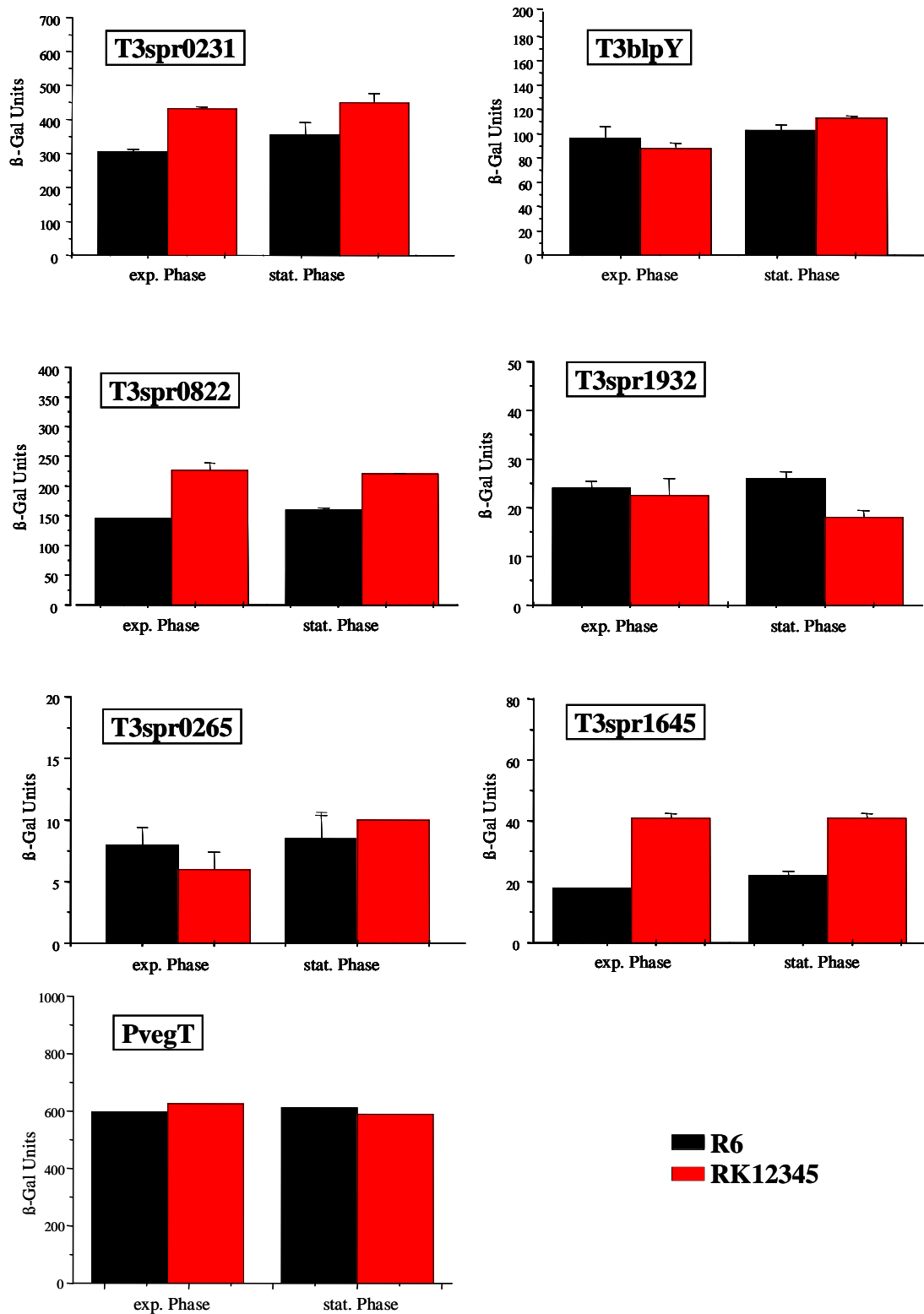


Abbildung 4.30: β -Galaktosidaseaktivitäten der 12 klonierten Zielgen'- 'lacZ -Fusionsproteine im Wildtyp *S. pneumoniae* R6 und in *S. pneumoniae* RK12345. Die Messungen wurden jeweils bei zwei Zeitpunkten durchgeführt: In der exponentiellen Phase bei einer Zelldichte von Nephelo 80 und kurz nach Eintritt in die stationäre Phase. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens 2 unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die Aktivitäten der Zielgen'- 'lacZ -Fusionsproteine in C-Medium sind schwarz für *S. pneumoniae* R6 und rot für *S. pneumoniae* RK12345 dargestellt. Als Kontrolle wurde die Promotoraktivität von P_{vegT} in beiden Stämmen bestimmt.

Die Ergebnisse der β -Galaktosidase-Messungen zeigen bei T3comA, T3hsdS, T3spr1610, T3blpY, T3spr1932 und T3spr0265 keine wesentlich veränderte Aktivität im Wildtyp R6 und im *ccnABCDE*-Deletionsstamm RK12345. Somit konnte *in vivo* keine csRNA-vermittelte posttranskriptionelle Regulation bei diesen sechs Genen ermittelt werden.

Bei zwei Konstrukten, T3spr0231 und T3spr0822 konnte eine leicht erhöhte Expression in RK12345 im Vergleich zum Wildtyp R6 gemessen werden. T3spr0231 zeigte in R6 eine Aktivität von 300 Units in der exponentiellen Phase und 350 Units in der stationären Phase. In RK12345 konnten in der exponentiellen Phase 420 Units und in der stationären Phase 450 Units gemessen werden. Diese Erhöhung entspricht einer weniger als 1,5-fach veränderten Expression. Bei T3spr0822, dem zweiten Konstrukt mit leicht veränderter Expression, konnte im Wildtyp R6 in der exponentiellen Phase und in der stationären Phase jeweils 150 Units gemessen werden. In RK12345 stieg die β -Galaktosidaseaktivität auf jeweils ca. 225 Units. Dies entspricht einer knapp 1,5-fach erhöhten Expression in RK12345, was auf eine geringe Regulation hindeuten könnte.

Bei vier Genen konnte eine eindeutige Expressionsveränderung festgestellt werden. Im Fall der Konstrukte T3comC, T3spr0081, T3cibB und T3spr1645 konnten ca. 2-fach bis 3,3-fach veränderte Aktivitäten in RK12345 gemessen werden.

Bei T3comC konnte eine knapp zweifache Erhöhung der Expression des CSP'- β -galactosidase-Fusionsproteins im Stamm mit fehlenden csRNAs festgestellt werden. Dieser Stamm, *S. pneumoniae* RK12345, zeigte in der exponentiellen Phase eine β -Galaktosidaseaktivität von 7000 Units im Gegensatz zu 4000 Units im Wildtyp *S. pneumoniae* R6. Bei der Messung in der stationären Phase zeigte sich der Unterschied noch deutlicher: 7500 Units im csRNA-Inaktivierungsstamm gegenüber 3500 Units im Wildtyp. Dies entspricht zusammengefasst eine knapp zweifache negative posttranskriptionelle Regulation der *comC*-mRNA.

Im Fall von T3spr0081 konnte sogar eine über dreifache Erhöhung der Expression des Spr0081'- β -galactosidase-Fusionsproteins in RK12345 festgestellt werden. Im Wildtyp *S. pneumoniae* R6 wurden jeweils ca. 150 Units gemessen, wogegen in RK12345 sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase eine β -Galaktosidaseaktivität von ca. 500 Units gemessen werden konnte.

Die gemessenen Aktivitäten deuteten sowohl bei T3cibB als auch bei T3spr1645 auf eine jeweils zweifache csRNA-abhängige posttranskriptionelle Regulation. Das CibB'- β -galactosidase-Fusionsprotein zeigte in RK12345, sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Phase eine β -Galaktosidaseaktivität von über 5500 Units. Im Wildtyp *S. pneumoniae* R6 wurden jeweils ca. 2500 Units gemessen. Die Aktivität des Spr1645'- β -galactosidase-Fusionsproteins lag im Wildtyp R6 bei 20 Units und in RK12345 bei über 40 Units.

4.8 Bestimmung der csRNA-abhängigen transkriptionellen- oder posttranskriptionellen-Regulation von *comC*, *spr0081*, *cibB* und *spr1645*

Im vorherigen Abschnitt wurde die posttranskriptionelle negative Regulation der Gene *comC*, *spr0081*, *cibB* und *spr1645* durch die csRNAs gezeigt. Wie bereits ausführlich beschrieben, wurde die Expression dieser vier Gene hierbei durch einen fremden, konstitutiv exprimierten Promotor P_{vegT} gewährleistet. Die klonierten Fragmente erstreckten sich, außer im Falle von *comA* und *comC*, deren +1 bekannt waren, nur über einige Basen um die vorhergesagten Interaktionsregionen. Die Methode der β -Galaktosidaseaktivitätsbestimmung der so konstruierten Fusionsproteine bot einen relativ einfachen und schnellen Weg zur Untersuchung der posttranskriptionellen Regulation der zahlreichen möglichen Zielgene. Das hierfür konstruierte Plasmid pTP3 eignete sich sehr gut für die Durchführung dieser Untersuchungen. Auf ähnliche Prinzipien basierende Konstruktionen und Screenings zur Auffindung von Zielgenen verschiedener kleiner RNAs werden auch bei Gram-negativen Organismen, wie *E. coli* und *Salmonella*, durchgeführt (Urban und Vogel, 2007).

Diese Methode ermöglicht, wie erwähnt, ein schnelles Screening, stellt aber gleichzeitig nur einen ersten Schritt in der Untersuchung der möglichen csRNA-Zielgene dar. Um die posttranskriptionelle Regulation der vier als reguliert gefundenen Gene bestätigen zu können, mussten weitere Analysen durchgeführt werden, wofür mindestens drei schwerwiegende Gründe sprachen. Zunächst kann eine transkriptionelle Regulation der Gene durch die vorherigen Analysen nicht aufgedeckt werden. Hierfür müssen die Promotoren der Gene im Wildtyp R6 und RK12345 untersucht und ihre Aktivität bestimmt werden. Zweitens ist die Promotorstärke der Gene ebenfalls unbekannt, was durchaus einen Einfluss auf die Stärke der Regulation haben kann. Durch einen schwach exprimierten Promotor ist beispielsweise eine geringe mRNA-Menge in den Zellen zu erwarten, wodurch die durch diese hervorgerufene Regulation stärker ausfallen könnte als bei starker Expression. Drittens könnte die Position der Gene in ihren Operonen auch eine Rolle bei der csRNA-vermittelten posttranskriptionellen Regulation spielen. Hierbei könnte die Regulation von Genen, welche nicht an der ersten Position liegen, beispielsweise durch die die mRNA translatierenden Ribosomen beeinträchtigt sein. Einen weiteren Einfluss könnten zudem die Abstände zwischen den Genen und die Faltstruktur der mRNA ausüben.

Hieraus wird deutlich, dass die Vermessung der Promotoraktivitäten der als reguliert gefundenen Gene zur Klärung der möglichen transkriptionellen Regulation unerlässlich war. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden in Abschnitt 4.8.2 vorgestellt. Zudem musste die posttranskriptionelle Regulation der Gene bei Expression ausgehend vom eigenen Promotoren und unter Berücksichtigung der authentischen Operonsstrukturen bestätigt werden. Diese Experimente werden in Abschnitt 4.8.3 erläutert.

4.8.1 Genetische Organisation von *comC*, *spr0081*, *cibB* und *spr1645*

Zuerst soll die genetische Organisation der als reguliert gefundenen Zielgene *comC*, *spr0081*, *cibB* und *spr1645* näher untersucht werden. Hierbei werden die Operonstrukturen und die Promotoren dieser Operone aufgezeigt. Außerdem sollen Einblicke in die Funktion dieser Gene gewährleistet werden.

Bei *comC* wurde eine knapp zweifache Regulation festgestellt. *comC* ist das erste Gen des *comCDE*-Operons. Der Transkriptionsstartpunkt des Operons sowie eine Regulation durch ComE ist bekannt. Das Genprodukt des *comC*-Gens ist das CSP Signal-Peptid. Das Vorläuferpeptid des CSP wird bei niedrigen Zelldichten auf einem basalen Level produziert. Der ComAB-Exporter prozessiert das Vorläuferpeptid und exportiert das CSP. Dieses reichert sich im Medium an. Bei Erreichen einer Zelldichte zwischen 20 bis 30 Nephelo-Units in C-Medium greift der quorum-sensing-Mechanismus und es kommt zur Aktivierung des ComE Response Regulators. Phosphoryliertes ComE bindet an die ComE-Bindestellen und aktiviert die Expression der frühen Kompetenzgene, zu welchen auch das *comCDE*-Operon zählt. Hierdurch kommt es zur autokatalytischen Verstärkung der ComCDE-Expression.

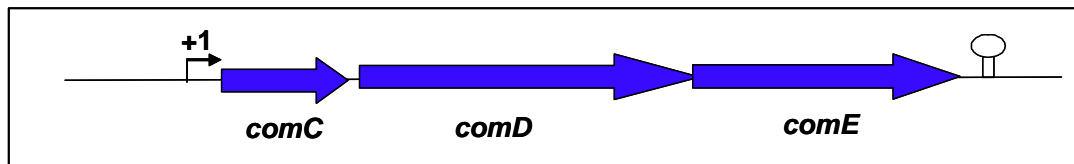


Abbildung 4.31: Genetische Organisation des *comCDE*-Operons. Das Operon besteht aus den Genen *comC*, *comD* und *comE*. Der Promotor und der Terminator des Operons ist eingezeichnet.

Das zweite reguliert gefundene Gen ist *spr0081*. Dieses ist das erste Gen eines Operons, welches aus 3 Genen besteht. Es kodiert für ein Membranprotein und stellt die Permease eines ABC-Transporters dar. Über die Regulation oder Funktion des Proteins liegen keine Daten vor. Das +1 des *spr0081*-Gens wurde während dieser Arbeit mittels 5'-RACE-Analyse bestimmt und befindet sich 65 bp stromaufwärts des *spr0081*-Startcodons. An dieser Stelle konnte eine Bindestelle, eine *cre*-site des CcpA-Katabolitrepersions-Proteins lokalisiert werden. Enzyme, welche im Metabolismus von komplexen Zuckern involviert sind, werden in Anwesenheit von einfachen Zuckern, wie Glukose, durch CcpA reprimiert (zusammengefasst in Deutscher *et al.*, 2006).

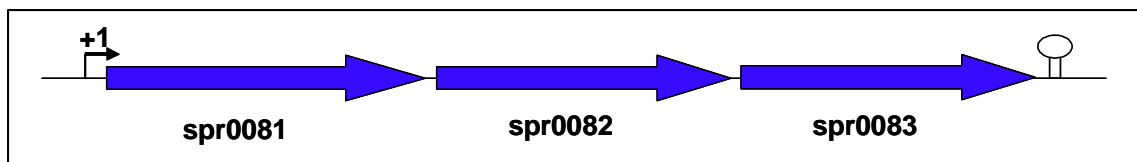


Abbildung 4.32: Genetische Organisation des *spr0081-0082-0083*-Operons. Das Operon besteht aus den Genen *spr0081*, *spr0082* und *spr0083*. Der Promotor des Operons ist eingezeichnet. Es konnte eine Terminatorstruktur identifiziert werden, welche ebenfalls eingezeichnet wurde.

Das dritte regulierte Gen *cibB* kodiert für ein putatives Bakteriocin und ist das zweite Gen des *cibABC*-Operons. Die Promotorsequenz des Operons ist bekannt. Das Operon gehört zu den späten Genen des Kompetenz-Regulons und wird durch den Sigma-Faktor ComX reguliert. CibB bildet gemeinsam mit CibA ein Zweipeptid-Bakteriocin und ist an der Kompetenz-induzierten Allolyse in *S. pneumoniae* beteiligt. Das *cibC*-Gen soll für das entsprechende Immunitätsprotein kodieren (Guiral *et al.*, 2005).

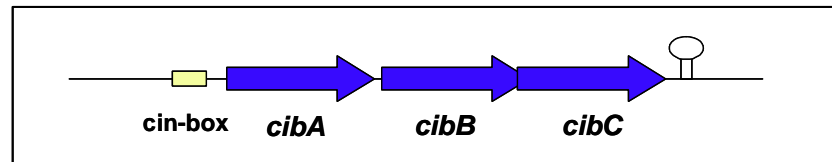


Abbildung 4.33: Aufbau des *cibABC*-Operons. Das Operon besteht aus den Genen *cibA*, *cibB* und *cibC*. Der Promotor des Operons, die *cin-box*, ist eingezeichnet. Es konnte ein Terminator am Ende des Operons identifiziert werden.

Das vierte regulierte Gen stellte *spr1645* dar. Dieses kodiert für ein Membranprotein und ist das zweite Gen seines Operons. Die beiden Gene des Operons kodieren für einen ABC-Transporter. Das Genprodukt von *spr1645* stellt das Substratbindeprotein des Transporters dar. Es liegen jedoch keine Untersuchungen zur Funktion oder Regulation der Proteine vor. Der Promotor des Operons konnte mittels 5'-RACE-Analyse nicht ermittelt werden. Es konnte jedoch eine stark konservierte -35 und -10 Region stromaufwärts des *spr1646*-Gens gefunden werden.

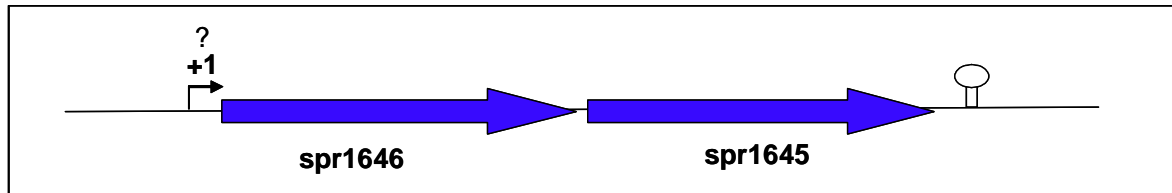


Abbildung 4.34: Aufbau des *spr1646-1645*-Operons. Das Operon besteht aus den Genen *spr1646* und *spr1645*. Der putative Promotor des Operons ist eingezeichnet. Es konnte eine Terminatorstruktur am Ende des Operons identifiziert werden.

4.8.2 Untersuchung der Promotoraktivität der *comC*, *spr0081*, *cibB* und *spr1645*

Durch die Untersuchung der Promotoraktivität der oben aufgezählten Gene soll eine eventuell vorhandene Regulation auf der Ebene der Transkription aufgedeckt bzw. ausgeschlossen werden. Um die Aktivität der Promotoren bestimmen zu können, wurden die Promotorfragmente in das bereits erwähnte Plasmid pPP2 vor das *lacZ* kodiert. Dieses Reportergen besitzt alle nötigen Signale zur Translationsinitiation, ihm fehlt lediglich ein Promotor. Durch Klonierung eines Promotorfragments wird die Expression des Reportergens unter die Kontrolle des klonierten Promotors gestellt. Die Klonierung erfolgt hierbei, wie bereits beschrieben, an den *SphI*- *BamHI*-Schnittstellen. Durch die

Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität können direkte Rückschlüsse auf die Aktivität des klonierten Promotors gezogen werden.

Die Sequenzen der klonierten Promotorfragmente werden im Folgenden dargestellt. Die *Sph*I- und *Bam*HI-Schnittstellen sind rot bzw. grün hinterlegt. Die klonierten Fragmente sind unterstrichen und die Shine-Dalgarno-Sequenz sowie das ATG des *lacZ* sind fett gedruckt.

In pPP2 klonierter *comC*-Promotor: Die -10-Region des *comCDE*-Operons ist gelb markiert. Grau ist das +1 und blau die ComE-Bindestelle hinterlegt.

```
ATCATGGCGA CCACACCCGT CCTGTGGATC TATCGATGCA TGGTGGGATC AATATAATAG
CAAAGCTGGG AATTTTCCCG GCTTTTTTCT TAAAAAAGTA CACTTTGGGA GAAAAAATG
ACAGTTGAGA GAATTTTATC TAAAACGAAA TTCCATTTTG TATAATGGTT TTTGTAAGTT
GGATCCTAAC TAGTTAAGGA GGCAAATATG AAACATCTTG ATCCCGTCGT TTTACAACGT
>>.....lacZ'.....>
```

In pPP2 klonierter *spr0081*-Promotor: Das +1 des *spr0081-spr0082-spr0083*-Operons ist grau hinterlegt. Die putative -35 und -10-Region ist gelb.

```
ATCATGGCGA CCACACCCGT CCTGTGGATC TATCGATGCA TGGCATTGT TGTATAGTGG
TGATAAAGTT TTAAATCTGC TACATAATTT GTGGAGTTTT TTCTATAATT AGGAGTTTAA
CCTAACCTGC AAATAGGAGT ATACTAATAA TGTAGGATCC TAACTAGTTA AGGAGGCAAA
TATGAAACAT CTTGATCCCG TCGTTTTACA ACGTCGTGAC TGGGAAAACC CTGGCGTTAC
>>.....lacZ'.....>>
```

In pPP2 klonierter *cibA*-Promotor. Der Promotor des *cibABC*-Operons, die cin-box, ist gelb markiert.

```
ATCATGGCGA CCACACCCGT CCTGTGGATC TATCGATGCA TGGAGACAAG AGTGCCCTCA
CTTAATAAAA AATAATTTAA AAAAATGCTC ACTTTTCCTT TTCTTTTCCG AATAATAAAG
TGAACAAGGG ATCCTAAC TA GTTAAGGAGG CAAATATGAA ACATCTTGAT CCCGTCGTTT
>>.....lacZ'.....>
```

In pPP2 klonierter *spr1646*-Promotor. Der putative Promotor des *spr1645-1646*-Operons ist gelb markiert.

```
ATCATGGCGA CCACACCCGT CCTGTGGATC TATCGATGCA TGGGATGATA CTGTCTATAT
GAGTGCTGTA TTTTGGAAAA ATTACTTAAC CTTTAAATGA AATGCATATT TAATGAAAGA
TAAATTAAAA AAAATGTTTG ACAGCGCTTG ACAAGGAAA CGGTTTCATT GTATAATGTA
AACATAGTGA CGGATCCTA C TAGTTAAGG AGGCAAATAT GAAACATCTT GATCCCGTCG
>>.....lacZ'.....>
```


Die Aktivität der klonierten Promotoren wurde mittels β -Galaktosidase-Assays, wie in Abschnitt 4.7.3 beschrieben, vermessen. Die Messungen wurden im Wildtyp R6 und im csRNA-Inaktivierungsstamm RK12345 durchgeführt. Hierbei wurden bei $P_{spr0081}$ und $P_{spr1645}$ die Messungen standardmäßig in der mittleren exponentiellen Phase bei einer Zelldichte von Nephelo 80 und kurz nach Eintritt in die stationäre Phase durchgeführt. Bei der Analyse von P_{comC} und P_{cibA} war ein verändertes Messexperiment erforderlich. Diese beiden Gene gehören zum Kompetenz-Regulon. Ihre Expression unterliegt dementsprechend der quorum-sensing vermittelten Kompetenz-Regulation. Die Expression des *comC*-Promotors steht hierbei unter der Kontrolle des ComE Response Regulators. Das *cibABC*-Operon gehört zu den späten Genen des Kompetenz-Regulons. Seine Expression wird durch den alternativen Sigma-Faktor ComX reguliert. Die Expression beider Operons steigt den Erwartungen zufolge nach dem Erreichen der kritischen Zelldichte in einem rasanten Tempo an. Um diesen Anstieg verfolgen zu können, wurden mehrere Messpunkte während des gesamten Wachstums durchgeführt. Auf die Ergebnisse der Messungen wird im Folgenden einzeln eingegangen.

Bei den durch den quorum-sensing Mechanismus regulierten Genen *comC* und *cibB* wurden Schwankungen in der Expression zwischen verschiedenen Messreihen festgestellt. Diese ließen sich durch die Verwendung von exakt gleichen Medien und Bedingungen etwas einschränken, konnten aber nicht vollständig umgegangen werden. Aus diesem Grunde schien die Darstellung von Mittelwerten aus verschiedenen Messungen nicht gerechtfertigt zu sein und es wurde hierauf verzichtet. Stattdessen werden zwei verschiedene repräsentative Experimente gezeigt.

Der *comC*-Promotor zeigte in beiden Stämmen erst nach Erreichen einer bestimmten Zelldichte eine Aktivität. Seine Expression erfolgte jedoch in RK12345 ca. 20 Minuten (ein Messpunkt) verspätet. Nach der Induktion erfolgt ein stetiger Anstieg der Promotoraktivität bis weit in die stationäre Phase. Dieser Befund scheint, vor dem Hintergrund, dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt keine Kompetenz mehr zeigen, eine interessante Beobachtung zu sein. Die β -Galaktosidaseaktivität erreicht schließlich in beiden Stämmen einen maximalen Wert von etwa 700 Units.

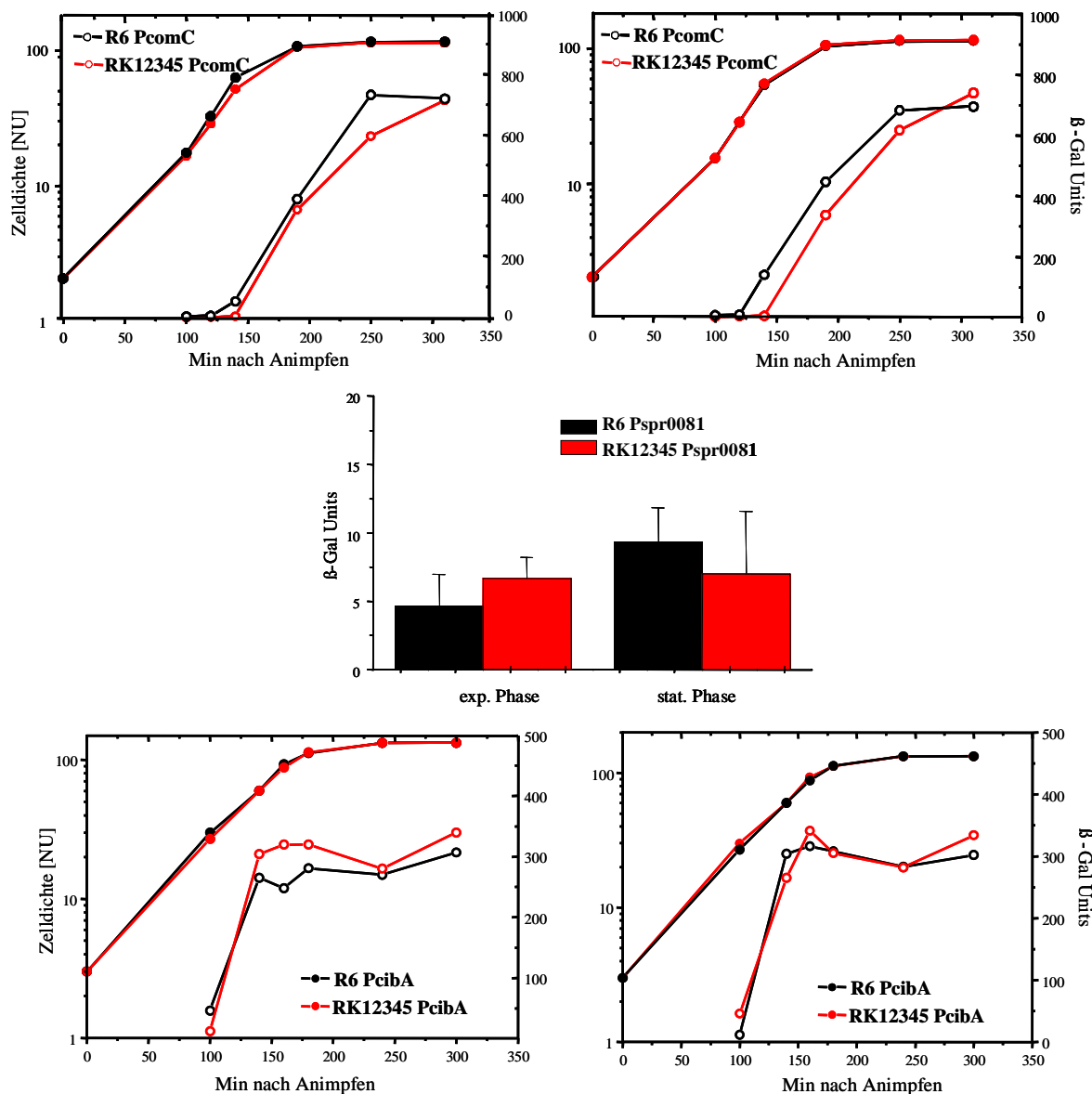
Der *spr0081*-Promotor zeigte in beiden Stämmen eine niedrige Aktivität und es konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden.

Die Messungen wurden in einem modifizierten C-Medium, welchem Laktose als Zuckerquelle zugesetzt wurde, durchgeführt. Der Grund für diese Modifikation wird in Abschnitt 4.8.3 erläutert.

Die Aktivität des ComX-regulierten *cibA*-Promotors wurde ebenfalls während des Wachstums verfolgt. Die Expression des Promotors im Wildtyp R6 und in RK12345 beginnt etwa zur gleichen Zeit, ab welcher eine steil ansteigende und sich stark ähnelnde Promotoraktivität in beiden Stämmen zu beobachten war. In der mittleren exponentiellen Phase, bei einer Nephelo von ca. 55, erreicht die Aktivität ein Niveau von ca. 300 Units, wonach kein weiterer Anstieg zu beobachten ist. Dies zeigt,

dass die Aktivierung des Promotors zu diesem Zeitpunkt keine weitere Erhöhung mehr erfährt. Die β -Galaktosidase neigt dazu, sich in den Zellen anzureichern und lange Aktivität zu zeigen. Deshalb ist eine Aussage über die Promotoraktivität nach dem Erreichen eines stagnierenden Expressionsniveaus problematisch. Da sich hier jedoch die Gesamtproteinmenge aufgrund der fortschreitenden Zellteilung erhöht und die Aktivität auf die Gesamtproteinmenge bezogen wird, ist hier eher von einer gleichbleibenden Promotoraktivität bis zum Erreichen der stationären Phase auszugehen. Die in der stationären Phase beobachteten Aktivitäten stammen vermutlich hauptsächlich von der angesammelten β -Galaktosidase, wodurch die Detektion der Abschaltung der Genexpression unmöglich gemacht wird.

Ausgehend vom spr1646-Promotor konnte ebenfalls keine wesentlich veränderte β -Galaktosidase-Expression in beiden Stämmen festgestellt werden. Die β -Galaktosidaseaktivität lag in beiden Stämmen zwischen 1200 und 800 Units.



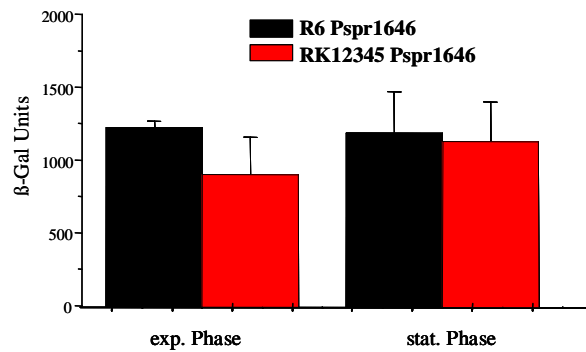


Abbildung 4.35: β -Galaktosidaseaktivität der *comC*-, *spr0081*-, *cibA*- und *spr1646*-Promotoren im Wildtyp *S. pneumoniae* R6 und in *S. pneumoniae* RK12345. Bei P_{comC} und P_{cibA} sind zwei repräsentative Experimente gezeigt. Die Messpunkte der Zelldichten der Wachstumskurve sind mit gefüllten Kreissymbolen und die β -Galaktosidase-Werte sind mit leeren Kreissymbolen dargestellt. Bei den Promotoren von *spr0081* und *spr1645* wurden die Messungen jeweils in der exponentiellen Phase bei einer Zelldichte von Nephelo 80 und kurz nach Eintritt in die stationäre Phase durchgeführt. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Protein. Die β -Galaktosidaseaktivitäten in C-Medium sind schwarz für *S. pneumoniae* R6 und rot für *S. pneumoniae* RK12345 dargestellt.

4.8.3 Untersuchung der posttranskriptionellen Regulation von *comC*, *spr0081*, *cibB* und *spr1645* bei Expression von ihren eigenen Promotoren

Die Promotoraktivitäten der Gene wurde zuvor bestimmt, wodurch eine Regulation auf der transkriptionellen Ebene in drei Fällen ausgeschlossen werden konnte. Allein im Fall von *comC* konnte eine verzögerte Induktion der Transkription in RK12345 ermittelt werden. Die Expressionsstärke stieg allerdings nach der verspäteten Induktion auf die gleiche Höhe wie auch im Wildtyp. Die in diesem Abschnitt beschriebene Untersuchung sollte vor diesem Hintergrund eindeutige Erkenntnisse bezüglich der posttranskriptionellen Regulation, sprich der vermuteten Hemmung der Translation der Proteine durch die csRNAs, erbringen.

Für die Untersuchung der posttranskriptionellen Regulation der Zielgene wurde das Translations Probe Plasmid pTP2 verwendet. Dieses Plasmid enthält das gleiche *lacZ*-Fragment wie auch das zuvor verwendete pTP3. Dieses *lacZ* besitzt ebenfalls keine Signale für die Translationsinitiation und kein Startcodon. In pTP3 wurde allerdings der Promotor P_{vegT} vorgeschaltet. pTP2 besitzt dagegen an dieser Stelle keinen Promotor. Hierdurch können Genfragmente, beginnend mit ihren eigenen Promotoren bis zu den ersten paar erwünschten Codons in frame vor das *lacZ*-Gen kloniert werden. Die Expression des Zielgen-*lacZ*-Fusionsproteins steht dadurch unter der Kontrolle des Promotors des zu untersuchenden Gens. Die hierbei klonierten Fragmente werden im Folgenden aufgeführt. Die *SphI*- und *BamHI*-Schnittstellen sind rot bzw. grün hinterlegt. Die klonierten Fragmente sind unterstrichen und die interagierenden Abschnitte sind fett gedruckt.

In pTP2 klonierte *comC*-Region: Der Promotor des *comCDE*-Operons ist gelb markiert. Grau ist das +1 des Operons hinterlegt, blau die ComE-Bindestelle.

```

ATCATGGCGA CCACACCCGT CCTGTGGATC TATCGATGCA TGC TGGGATC AATATAATAG
CAAAGCTGGG AATTTTCCCG GCTTTTTTCT TAAAAAAGTA CACTTTGGGA GAAAAAATG
ACAGTTGAGA GAATTTTATC TAAAACGAAA TTCCATTTTG TATAATGGTT TTTGTAAGTT
AGCTTACAAG AAAAAACATT TTAGGAGATT TTATTATGAA AAACACAGTT AAATTGGAAC
>>.....comC'-'lacZ'.....>

AGTTTGTAGC TTTGGATCC C GTCGTTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAAC CCTGGCGTTA
>.....comC'-'lacZ'.....>

```

In pTP2 klonierte *spr0081*-Region. Die -10 und -35 Region des Operons ist gelb markiert. Das +1 ist grau hinterlegt. Der cre-site ist blau gedruckt.

```

ATCATGGCGA CCACACCCGT CCTGTGGATC TATCGATGCA TGCCATTTGT TTGATAGTGG
TGATAAAGTT TTAAATCTGC TACATAATTT GTGGAGTTTT TTCTATAATT AGGAGTTTAA
CCTAACCTGC AAATAGGAGT ATACTAATAA TGTAAATCGTT ATCAAAAGTC TAAAAAGAA
TTTTTAGATG GATATCAAAA TAAAAAGGGA GGAAATTATG AAAAAGTTTT CAAAAACGGA
>>...spr0081'-'lacZ'.....>

TCCCGTCGTT TTACAACGTC GTGACTGGGA AAACCCTGGC GTTACCCAAC TTAATCGCCT
>.....spr0081'-'lacZ'.....>

```

In pTP2 klonierte *cibAB*-Region. Der Promotor des Operons, die cin-box, ist gelb markiert.

```

ATCATGGCGA CCACACCCGT CCTGTGGATC TATCGATGCA TGCCAGACAAG AGTGCCCTCA
CTTAATAAAA AATAATTTAA AAAAATGCTC ACTTTTCCTT TTCTTTTCCG AATAATAAAG
TGAACAAGAA AAAAGGAGGA AAGTTCAATG ACAAATTTTG ACATTCTTGA CAATCAATTT
>>.....cibA.....>

TTATCCTTAT CTGAAAATGA ATTGTCAGAT ATTGATGGCG GTCTCGCTCC CTTGGTTATC
>>.....cibA.....>

TTTGGAGTAG CAGTATCTTG GAAGGCTATT GCAGGTGGAA CAGCACTTAT AGGTTCTGGT
>>.....cibA.....>

TTGGCAGCTG GTTATTTTTT AGGAGGAGAT TAATATGATG AAAAATTTGA ACAACTATCG
>>.....cibA.....> >>.....cibB-lacZ'.....>

GGATCCCGTC GTTTTACAAC GTCGTGACTG GGAAAACCCT GGC GTTACCC AACTTAATCG
>.....cibB-lacZ'.....>

```

In pTP2 klonierte spr1646-1645-Region. Der putative Promotor ist gelb markiert.

```

ATCATGGCGA CCACACCCGT CCTGTGGATC TATCGATSCA TGC GATGATA CTGTCTATAT
GAGTGCTGTA TTTTGGAAAA ATTACTTAAC CTTTAAATGA AATGCATATT TAATGAAAGA
TAAATTAAAA AAAATGTTTG ACAGCGCTTG ACA AAGGAAA CGGTTTCATT GTATAATGTA
AACATAGTGA CACCGATGTC AAATATAAAA AAGAAGGTCT TTATATGAAA AACTTAACAA
>>...spr1646....>

AAATTAAGTT CAAAGAGAAT GGGGAATTTA ATCATTTCCT TGGGAATACA GTTGTAGCAA
>.....spr1646.....>
-----540 bp-----

AAGATATGAG ACAATTTGTT CCATATCACG AAAAATTTAA ATAAATAAT AAAAAAGGAG
>.....spr1646.....>>

AACTTATCAT GAAAAAATG AAAGTTTGGT CTACTGTGGA TCC CGTCGTT TTACAACGTC
>>.....spr1645'-lacZ'.....>>

```

Die Aktivität der Zielgen'-lacZ-Fusionsproteine in Abhängigkeit der csRNAs wurde mittels β -Galaktosidase-Assays, wie in Abschnitt 4.7.3 beschrieben, vermessen. Hierbei wurden bei T2spr0081 und T2spr1645-spr1646 die Messungen wieder standardmäßig in der mittleren exponentiellen Phase bei einer Zelldichte von Nephelo 80 und kurz nach Eintritt in die stationäre Phase durchgeführt. Bei T2comC und T2cibAB wurden, wie auch bei der Bestimmung ihrer Promotoraktivitäten, mehrere Messungen während des Wachstums durchgeführt.

Es konnte eine erhöhte Expression des ComC'-lacZ-Fusionsproteins im Stamm mit fehlenden csRNAs festgestellt werden. In beiden Stämmen konnte ein schneller Anstieg der β -Galaktosidaseaktivität gemessen werden, der sich bis in die stationäre Wachstumsphase fortsetzte. Das Maximum wurde kurz vor dem Erreichen der stationären Phase erreicht. Die β -Galaktosidaseaktivität in *S. pneumoniae* RK12345 erreichte über 5000 Units. Im Wildtyp R6 konnten dagegen maximal ca. 3000 β -Galaktosidase-Units gemessen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die vorher bestimmte, ca. zweifache posttranskriptionelle Regulation. Die maximal gemessenen Aktivitäten betragen zwar keinen zweifachen Unterschied, jedoch wird dieser Unterschied bei weiteren Messpunkten in der exponentiellen Phase weit überschritten.

Bei den standardmäßig im C-Medium durchgeführten Messungen des Spr0081'-lacZ-Fusionsproteins konnte keine Aktivität gemessen werden. Dies deutete darauf, dass das spr0081-Gen unter den angewendeten Bedingungen nicht exprimiert wurde. Wie bereits bei der Darstellung der genetischen Organisation dieses Gens erwähnt, konnte die Erkennungssequenz des Katabolit-Repressorproteins CcpA am Transkriptionsstartpunkt des Gens identifiziert werden. Eine Repression des Promotors durch diesen Regulator ist also vorstellbar.

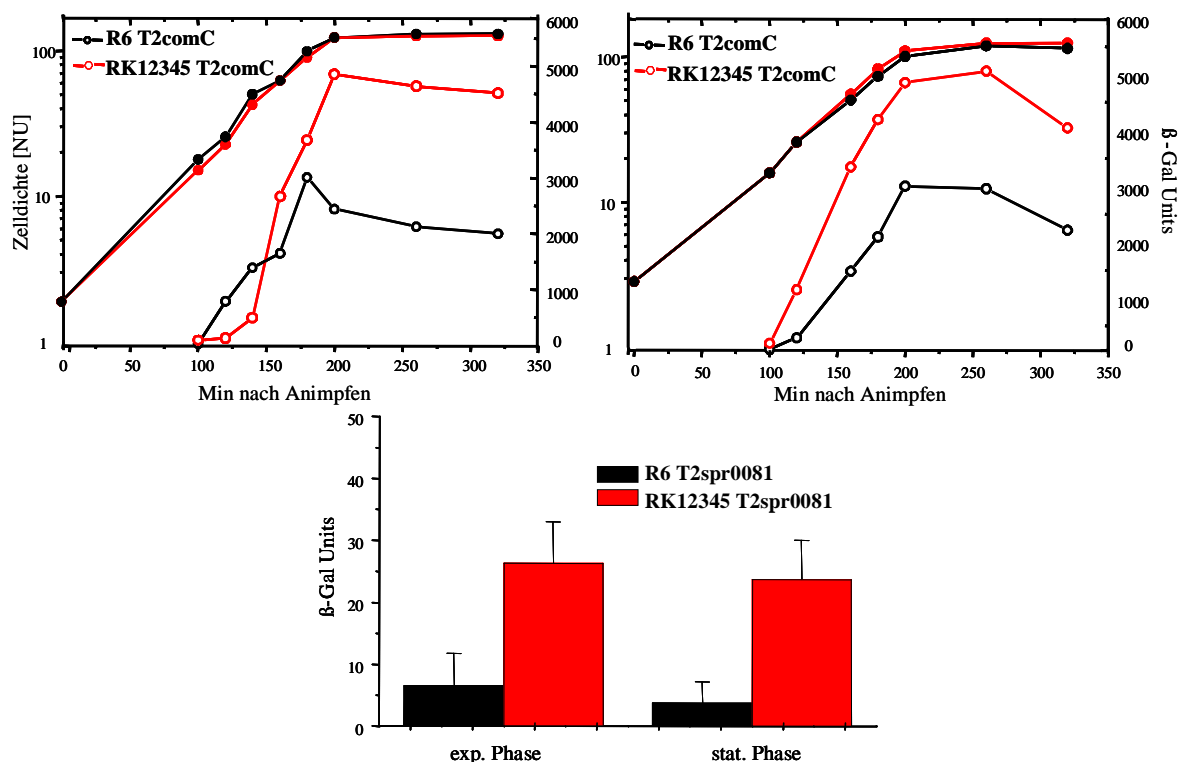
Um die Expression des Gens zu ermöglichen und untersuchen zu können, wurden beide Stämme in einem modifizierten C-Medium angezogen. Dem standardmäßig verwendeten C-Medium wird als Kohlenhydratquelle Saccharose und Glukose beigelegt. In diesem modifizierten Medium wurden diese Zucker durch Laktose ersetzt. Die Durchführung der Experimente wurde ansonsten nicht verändert.

Bei Wachstum in Anwesenheit von Laktose konnte im Wildtyp *S. pneumoniae* R6 bei beiden Zeitpunkten eine Aktivität von 7 bis 3 Units gemessen werden. Im Gegensatz hierzu konnten in der csRNA-Mutante *S. pneumoniae* RK12345 zu beiden Zeitpunkten jeweils ca. 25 Units detektiert werden.

Diese Ergebnisse deuten zum einen auf eine CcpA-abhängige Regulation des Operons und zum anderen auf eine ca. fünffach negative posttranskriptionelle Regulation von spr0081 durch die csRNAs hin.

Die posttranskriptionelle Regulation konnte bei *cibB* und spr1645 nicht bestätigt werden. Die Aktivität des CibB'-lacZ-Fusionsproteins begann bei einer Zelldichte von ca. 30 Nephelo und zeigte analog zu den zuvor beschriebenen Promotoraktivitäten einen schnellen Anstieg. Die maximale Aktivität wurde in der späten exponentiellen Phase erreicht und beträgt um die 400 β -Galaktosidase-Units. Es sind Schwankungen in der Aktivität zu verzeichnen, jedoch konnte die csRNA-vermittelte posttranskriptionelle Regulation nicht bestätigt werden.

Das Spr1645'-lacZ-Fusionsprotein zeigte in beiden Stämmen annähernd die gleiche Aktivität. Die Messungen ergaben in beiden Stämmen 50 bis 60 Units.



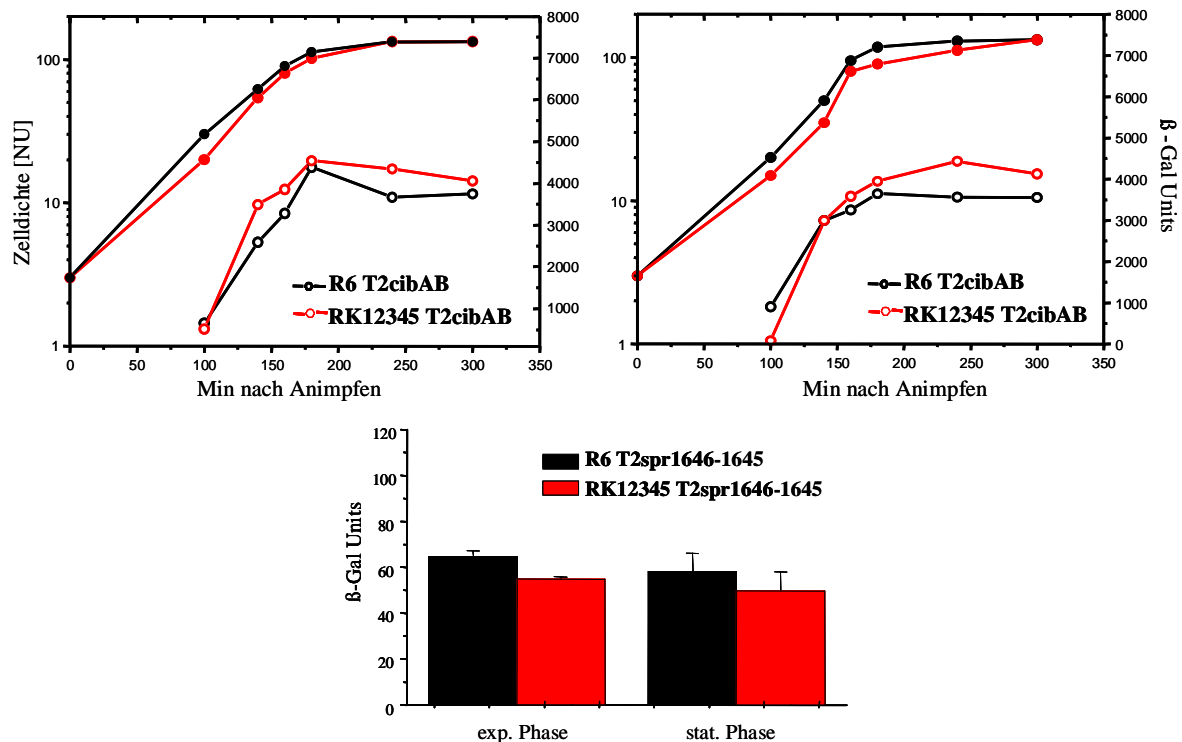


Abbildung 4.36: β -Galaktosidaseaktivität der Zielgen-Fusionsproteine im Wildtyp R6 und in RK12345 bei Expression ausgehend von ihren eigenen Promotoren. Bei T2comC und T2cibAB sind zwei repräsentative Experimente gezeigt. Die Messpunkte der Zelldichten der Wachstumskurve sind mit gefüllten Kreissymbolen und die β -Galaktosidase-Werte sind mit leeren Kreissymbolen dargestellt. Bei T2spr0081 und T2spr1646-spr1645 wurden die Messungen jeweils in der exponentiellen Phase bei einer Zelldichte von Nephelo 80 und kurz nach Eintritt in die stationäre Phase durchgeführt. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Protein. Die Aktivitäten der Zielgen'- lacZ -Fusionsproteine in C-Medium sind schwarz für *S. pneumoniae* R6 und rot für *S. pneumoniae* RK12345 dargestellt.

In diesem Kapitel wurde die Untersuchung der transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulation von *comC*, *spr0081*, *cibB* und *spr1645* in Abhängigkeit der csRNAs beschrieben. Die unveränderte Expression der Promotoren zeigte, mit Ausnahme von P_{comC} , dass diese von den csRNAs in keiner Weise beeinflusst werden. Bei P_{comC} konnte eine um ca. 20 Minuten verspätete Expressionsinduktion in RK12345 beobachtet werden, wonach jedoch die volle Expressionshöhe erreicht wurde.

Bei der Herstellung der Zielgen'- lacZ -Fusionsproteine mit Hilfe des pTP2 Plasmids wurden die gesamten Bereiche stromaufwärts der zu untersuchenden Gene, einschließlich ihrer Promotoren, kloniert. Hiermit ist einerseits die Expression der Gene ausgehend von ihren eigenen Promotoren gewährleistet und andererseits ist die Auswirkung der stromaufwärts der interagierenden Abschnitte liegenden mRNA-Struktur auf die Interaktion zwischen den mRNAs der Zielgene und den csRNAs messbar. Durch die Messung der β -Galaktosidaseaktivität des nachgeschalteten lacZ -Reportergens konnten direkte Rückschlüsse auf die Interaktion und der dadurch hervorgerufenen posttranskriptionelle Regulation der Zielgene gezogen werden. Die Gene *comC* und *spr0081* sind die

ersten Gene ihrer Operons. Bei diesen Genen konnte die posttranskriptionelle Regulation durch die csRNAs bestätigt werden. Die Gene *cibB* und *spr1645* sind die zweiten Gene ihrer Operons. Die mit Hilfe des pTP3 festgestellte Regulation konnte hier nicht bestätigt werden. Möglicherweise wird die Interaktion der mRNA und der csRNAs durch die Struktur der mRNA oder durch die Translation der ersten Gene gehemmt.

4.9 *in vitro*-Untersuchung der direkten Interaktion der mRNA von *comC* und *spr0081* mit den csRNAs mittels Bandshift-Analyse

Die direkte Interaktion der mRNA der Zielgene *comC* und *spr0081* mit den csRNAs wurde *in vitro* untersucht. Hierzu wurde eine neuartige Bandshift-Analyse etabliert. Solche Analysen werden üblicherweise unter Verwendung radioaktiver Substanzen durchgeführt. Eine der interagierenden RNAs wird radioaktiv markiert und die andere in steigender Konzentration zugegeben. Die Detektion wird dann durch die radioaktiven Signale ermöglicht.

In unserer Abteilung stand jedoch die Detektionsmöglichkeit mit SYBRGreenII zur Verfügung. Das SYBRGreenII ist für die Färbung einzel- oder doppelsträngiger RNA geeignet. Die Detektion erfolgte mit einem FluorImager 595 (Molecular Dynamics) bei einer Wellenlänge von 514 nm. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nicht wie bei der radioaktiven Markierung nur die markierte RNA, sondern das gesamte Gel gefärbt wird und somit alle aufgetragenen RNAs sichtbar sind. Im Gegensatz zur radioaktiven Detektion müssen jedoch bei der SYBRGreenII-Methode höhere Konzentrationen an RNA eingesetzt werden.

Die ersten 170 Basen der *comC*- und *spr0081*-mRNAs wurden *in vitro* mit der T7 RNA-Polymerase produziert. Als Template für die Synthese dienten PCR-Fragmente mit angehängten T7 Promotorsequenzen. Als Negativkontrolle wurde ein *htrA*-Fragment verwendet. Es wurden auch hier die ersten 170 Basen der mRNA produziert. Die csRNAs wurden ebenfalls hergestellt.

Zur Kontrolle wurden die *in vitro* produzierten RNAs auf einem denaturierenden PAA-Gel und einem nativen PAA-Gel aufgetragen und bei 4 °C und 12 mA ca. 2 Stunden aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele mit SYBRGreenII gefärbt und eingescannt. Im denaturierenden Gel konnten klar definierte RNA-Banden auf den entsprechenden Höhen detektiert werden. Auf den nativen PAA-Gele zeigten die csRNAs ein verändertes Laufverhalten: Bei allen csRNAs konnten Mehrfachbanden in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander beobachtet werden. Um die Ursache dieses Laufverhaltens aufzuklären, wurde csRNA3 in verschiedenen Puffern gelöst und auf einem nativen Gel aufgetrennt (Abbildung 4.37). Hierbei zeigte sich, dass csRNA3 in Anwesenheit von Ionen stets Doppelbanden lieferte. Allein durch Lösen in Wasser (Spur 2), was zur Denaturierung führt, konnte eine Einzelbande detektiert werden. Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei den Mehrfachbanden um verschiedene Konformationen der csRNAs handeln muss.

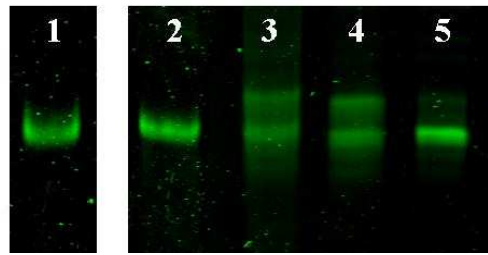


Abbildung 4.37: Laufverhalten der *in vitro* produzierten csRNA3 im denaturierenden und nativen PAA-Gel. Es wurden jeweils 160 nM csRNA3 aufgetragen und nach der Auftrennung mit CYBRGreenII gefärbt. In Spur 1 ist csRNA3 auf einem denaturierenden Gel zu sehen. Im Spur 2, 3, 4 und 5 ist csRNA3 auf einem nativen Gel, in verschiedenen Lösungsmittel gelöst, aufgetragen. In Spur 2 ist csRNA3 in Wasser, in Spur 3 in TMN-Puffer, in Spur 4 in Tris-Puffer (pH 8) und in Spur 5 in TE-Puffer gelöst.

Für die Interaktionsstudie wurde jeweils 160 nM Zielgen-mRNA und 160 nM *htrA*-Kontroll-RNA eingesetzt. Die csRNAs wurden mit steigender Konzentration zugegeben. Es wurden jeweils 4 Ansätze hergestellt. Die Zielgen-Ansätze wurden mit 0 nM, 80 nM, 160 nM und 800 nM csRNA versetzt. Bei den *htrA*-Kontrollansätzen wurde 0 nM, 160 nM, 800 nM und 1600 nM csRNA verwendet. Die Interaktion erfolgte über 20 Minuten in TMN-Puffer. Die genaue Zusammensetzung der Ansätze ist in Abschnitt 3.3.6 beschrieben. Die Ansätze wurden anschließend auf ein natives PAA-Gel aufgetragen und bei 4°C und 12 mA aufgetrennt. Die Färbung der Gele erfolgte mit SYBRGreenII. Dokumentiert wurde durch Scannen mit einem FluorImager bei 514 nm.

Interaktionsassay mit *comC*

Die Interaktionsassays wurden mit allen 5 csRNAs durchgeführt. Bei csRNA2, csRNA3, csRNA4 und csRNA5 konnten klare Interaktionsbanden detektiert werden. Gleichzeitig konnte in diesen Spuren das Verschwinden der *comC*-RNA auf ihrer eigentlichen Laufhöhe beobachtet werden. Die Interaktionsbanden verhielten sich bezüglich ihres Laufverhaltens ähnlich wie die csRNAs und erschienen als Doppelbanden. Bei csRNA1 konnten keine eindeutigen Interaktionsbanden gesichtet werden, jedoch wurde die *comC*-Bande auch hier auf ihrer eigentlichen Laufhöhe mit steigender csRNA1-Konzentration schwächer. Außerdem bildet csRNA1 eine zusätzliche schwache Bande auf einer Höhe, welche ungefähr ihrer doppelten Größe entspricht (Abbildung 4.38, Spur 5). Diese Bande ist auch in den beiden letzten Spuren in Anwesenheit der als Negativkontrolle dienenden *htrA*-RNA zu sehen.

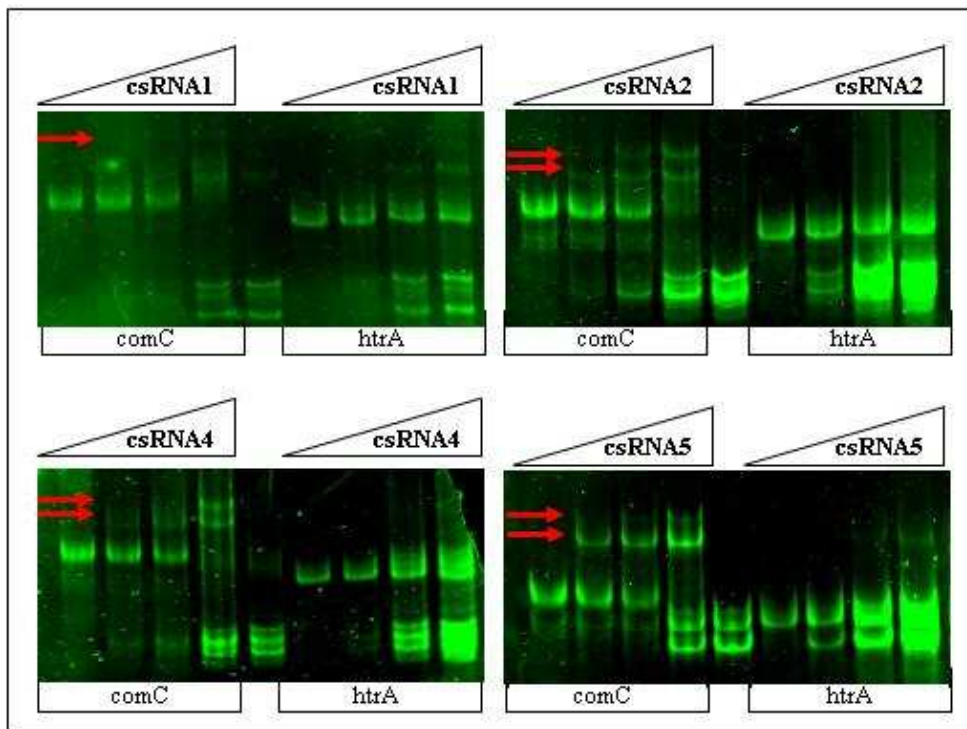


Abbildung 4.38: Bandshift-Assays der *comC*-RNA mit csRNA1, csRNA2, csRNA4 und csRNA5. Es wurden jeweils 9 Ansätze gefahren. In den ersten vier Spuren befinden sich jeweils die *comC*-Ansätze. In der ersten Spur ist die *comC*-RNA (160 nM) ohne Zugabe von csRNA. In den Spuren 2, 3 und 4 wurde csRNA in 0,5-fachem, einfachem und fünffachem Überschuss zugegeben. In der Spur 5 ist die jeweilige csRNA alleine aufgetragen (800 nM). In den Spuren 5-8 sind die *htrA*-Kontrollansätze aufgetragen. In Spur 5 das *htrA*-mRNA (160 nM) ohne csRNA. In den Spuren 6, 7 und 8 ist die jeweilige csRNA in einem einfachen, fünffachen bzw. zehnfachen Überschuss dazugegeben. Die Interaktionsbanden sind mit roten Pfeilen markiert.

Um die Zusammensetzung der Interaktionskomplexe sicher bestimmen zu können wurden von *comC*/csRNA3-Interaktionsgelen Northern Blot-Analysen durchgeführt. Beide interagierenden RNAs sollten auf jeweils einem Blot detektiert werden. Auf dem ersten Blot wurde eine csRNA3-spezifische Sonde verwendet. Die Interaktionsbande konnte mit dieser Sonde klar detektiert werden. Bereits in der ersten Spur, in welcher nur eine 0,5-fache Menge der csRNA3 im Vergleich zur *comC*-RNA verwendet wurde, erschien eine klare Interaktionsbande.

Im nächsten Blot sollte die RNA des Zielgens *comC* und die *htrA*-Kontroll-RNA detektiert werden. Dafür wurde die Membran nach dem Blotten in der Mitte durchtrennt. Die *comC*-Seite wurde mit einer *comC*-Sonde hybridisiert und die *htrA*-Seite entsprechend mit einer *htrA*-spezifischen Sonde. Die *comC*-RNA konnte in beiden Interaktionsbanden detektiert werden. Gleichzeitig konnte in den entsprechenden Spuren das Verschwinden der *comC*-RNA auf ihrer eigentlichen Laufhöhe beobachtet werden.

Diese Untersuchung bestätigt, dass die Interaktionskomplexe aus den beiden interagierenden RNAs bestehen.

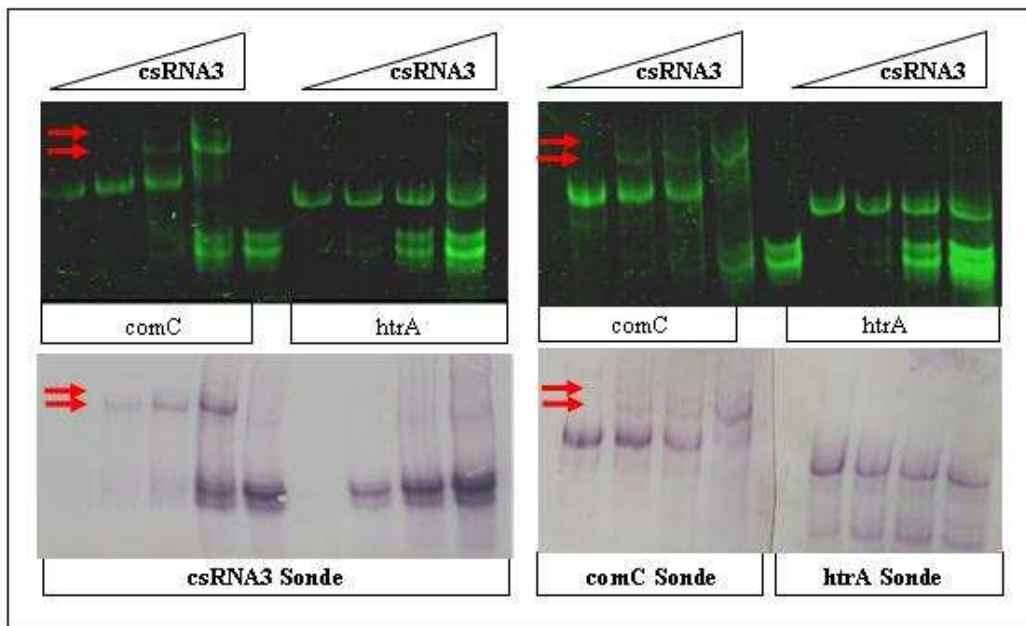


Abbildung 4.39: Bandshift-Assays und Northern Blot-Analyse der Interaktionskomplexe der *comC*-RNA und *csRNA3*. Die oberen Bilder zeigen die SYBRGreenII-gefärbten Bandshift Gele. Die Gelbelastung ist wie zuvor beschrieben. Die Interaktionsbanden sind mit roten Pfeilen markiert. Die unteren Bilder zeigen die geblotteten Gele. Beim linken Bild wurde zur Detektion eine für die *csRNA3* spezifische Sonde verwendet. Beim rechten Bild wurde die Membran durchtrennt und *comC*- bzw. *htrA*-spezifische Sonden verwendet. Die geblotteten Interaktionsbanden sind mit roten Pfeilen markiert.

Interaktionsassay mit *spr0081*

Die Interaktionsassays wurden mit allen 5 *csRNAs* durchgeführt. Bei *csRNA2*, *csRNA3*, *csRNA4* und *csRNA5* konnten klare Interaktionsbanden detektiert werden. Gleichzeitig konnte in diesen Spuren das Verschwinden der *spr0081*-RNA auf ihrer eigentlichen Laufhöhe beobachtet werden. Bei *csRNA1* konnten keine eindeutigen Interaktionsbanden gesichtet werden und die *spr0081*-Bande veränderte sich ebenfalls nicht. Somit bildete die *spr0081*-RNA keinen Interaktionskomplex mit *csRNA1*. Auch hier bildete *csRNA1* Banden auf etwa doppelter Höhe (Abbildung 4.40, Spur 5). Diese Banden waren auch in den letzten Spuren der Negativkontrolle zu sehen.

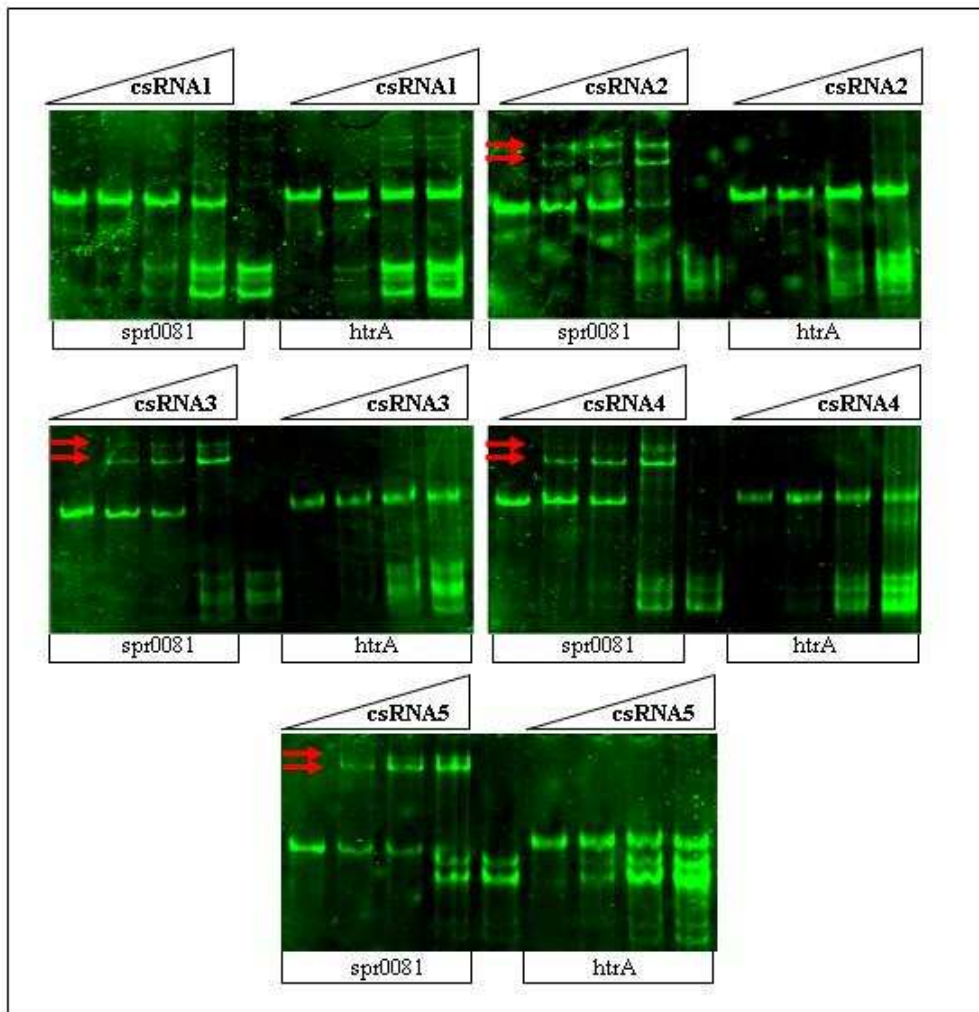


Abbildung 4.40: Bandshift-Assays der spr0081-RNA mit csRNA1, csRNA2, csRNA3, csRNA4 und csRNA5. Es wurden jeweils 9 Ansätze gefahren. In den ersten vier Spuren befinden sich jeweils die spr0081-Ansätze. In der ersten Spur ist die spr0081-RNA (160 nM) ohne Zugabe von csRNA. In den Spuren 2, 3 und 4 wurde csRNA in einem 0,5-fachen, einfachen und fünffachen Überschuss zugegeben. In Spur 5 ist jeweils nur csRNA (800 nM) aufgetragen. In den Spuren 5-8 sind die *htrA*-Kontrollansätze aufgetragen. In Spur 5 ist *htrA* ohne csRNA aufgetragen (160 nM). In den Spuren 6, 7 und 8 ist die jeweilige csRNA in einem einfachen, fünffachen und zehnfachen Überschuss dazugegeben. Die Interaktionsbanden sind mit roten Pfeilen markiert.

Die Interaktion zwischen der mRNA der Zielgene *comC* und spr0081 und den csRNAs wurde untersucht. Die mRNA des *comC*-Gens bildete mit allen 5 csRNAs Interaktionskomplexe. Der Interaktionskomplex mit der csRNA1 war nicht sichtbar, jedoch deutete das Verschwinden der *comC*-RNA auf ihrer Laufhöhe eine Interaktion an. Diese Interaktion scheint nicht stark ausgeprägt. Die Interaktionsbande bildet somit wahrscheinlich einen Schmier im Gel.

Die *comC*/csRNA3-Interaktionskomplexe wurden mittels Northern Blot-Analyse untersucht. Es wurde gezeigt, dass diese Komplexe, wie erwartet, sowohl csRNA3 als auch *comC*-RNA beinhalten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bereits bei 0,5-facher csRNA3-Menge ein Shift erfolgt.

Die Bandshift-Analyse wurde auch mit dem spr0081-Gen durchgeführt. Hier konnten, außer mit der csRNA1, starke Interaktionsbanden detektiert werden. Die spr0081-RNA konnte mit csRNA1 keine sichtbare Interaktion eingehen. Die mit Hilfe des 2-state-hybridisation-Servers berechnete freie negative Energie dieses Komplexes ist -14 kcal/mol. Als Kriterium bei der Suche nach den Zielgenen wurden mindestens -18 kcal/mol angesetzt. Dieses Ergebniss stellt eine wertvolle Kontrolle für die verwendeten Kriterien dar.

4.10 Untersuchung der Auswirkung einzelner csRNAs auf die Translation von *comC*

Die csRNA-abhängige Regulation der Translation des *comC*-Gens wurde in den vorherigen Abschnitten gezeigt. Die Messungen der β -Galaktosidaseaktivität des ComC'-lacZ-Fusionsproteins wurde im Wildtyp R6, in welchem alle csRNAs aktiv sind und in *S. pneumoniae* RK12345, in welchem keine csRNA mehr vorhanden ist, durchgeführt. Im Stamm mit fehlenden csRNAs konnte eine zweifach erhöhte Expression des Fusionsproteins festgestellt werden. Hierbei stellte sich die Frage, in welchem Maße die einzelnen csRNAs an der Regulation beteiligt sind. Die Bandshift-Analyse der csRNAs mit der *comC*-mRNA deutet darauf hin, dass alle csRNAs an der Regulation beteiligt sind, da mit jeder csRNA Interaktionsbanden detektiert werden konnten.

Die Auswirkung der einzelnen csRNAs auf die Translation des *comC*-Gens wurde mittels Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität untersucht. Hierzu wurde das pTP3comC-Plasmid (Abschnitt 4.7.2) in verschiedene Stämme, welche im Folgenden aufgelistet werden, eingeführt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 4.41 dargestellt. Der Wildtypstamm R6 (rot) diente als Kontrolle. Hier werden alle csRNAs exprimiert und es konnten 3538 Units gemessen werden. In *S. pneumoniae* RK12345 (grün) sind alle Gene für die csRNAs deletiert und in *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* (hellblau) ist nur ein verschwindend geringer Anteil an csRNA3 vorhanden (Abschnitt 4.1.2). In diesen beiden Stämmen konnten ca. 6550 Units gemessen werden. *S. pneumoniae* RK2345 (braun) exprimiert nur csRNA1 und die Expression sank auf 5556 Units. *S. pneumoniae* RK1345 (grau) exprimiert nur csRNA2 und die Expression ist leicht erniedrigt auf 6207 Units. *S. pneumoniae* RK1245 (dunkelblau) exprimiert nur csRNA3 und die Expression sank auf 5232 Units. *S. pneumoniae* RK45 (pink) exprimiert csRNA1, csRNA2 und csRNA3 und die Expression fiel ab auf 3775 Units. Die Translationsregulation durch diese drei csRNAs erreicht annähernd das gleiche Level, wie bei der Regulation durch alle 5 csRNAs im Wildtyp R6. *S. pneumoniae* RK1235 (kakigrün) exprimiert nur csRNA4 und die Expression sank erheblich auf 4085 Units. *S. pneumoniae* RK1234 (gelb) exprimiert nur csRNA5 und die Expression fiel ab auf 4921 Units. *S. pneumoniae* RK123 (türkis) exprimiert csRNA4 und csRNA5 und die Expression sank auf 3685 Units, was sich wiederum in der Nähe des ComC'-lacZ-Expressionslevels im Wildtyp R6 befindet.

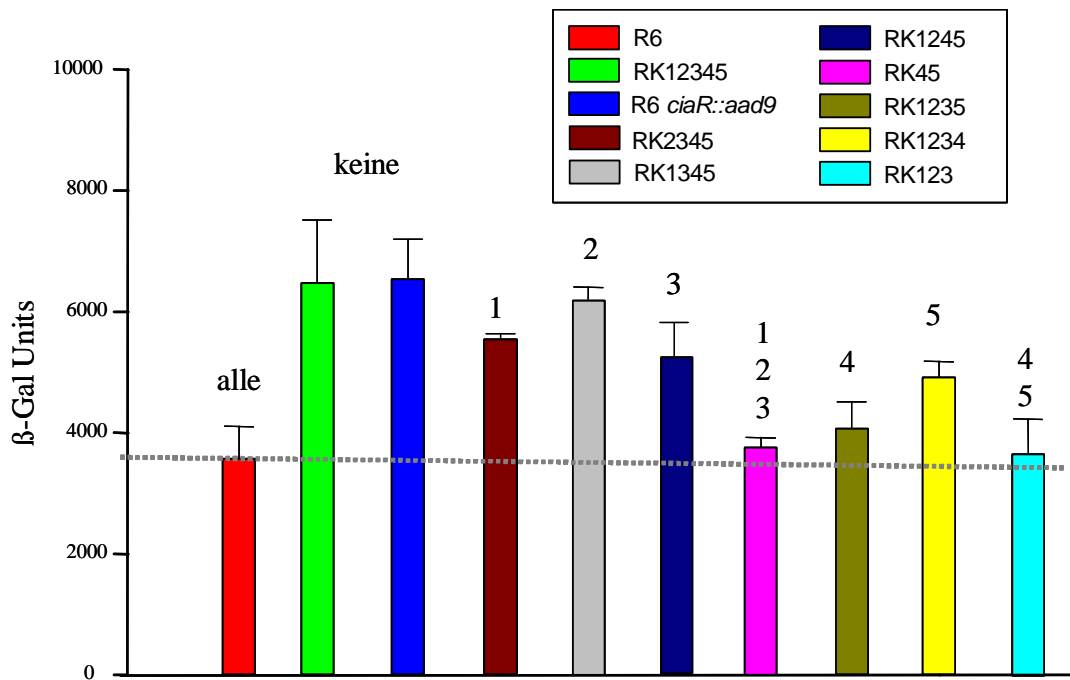


Abbildung 4.41: β -Galaktosidaseaktivität des CSP'- lacZ -Fusionsproteins im Wildtyp *S. pneumoniae* R6, *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9* und in verschiedenen *ccn*-Deletionsstämmen. Die in den entsprechenden Stämmen vorhandenen csRNAs sind oberhalb der dazugehörigen Balken gekennzeichnet. Die Messungen wurden jeweils bei einer Zelldichte von Nephelo 80 durchgeführt. Units sind definiert als nmol freigesetztes ONP/min/mg Protein. Die Mittelwerte von mindestens 2 unabhängigen Experimenten sind gezeigt. Die Aktivitäten der CSP'- lacZ -Fusionsproteins in C-Medium sind rot für *S. pneumoniae* R6, grün für *S. pneumoniae* RK12345, hellblau für *S. pneumoniae* R6 *ciaR::aad9*, braun für *S. pneumoniae* RK2345, grau für *S. pneumoniae* RK1345, dunkelblau für *S. pneumoniae* RK1245, rosa für *S. pneumoniae* RK45, kakigrün für *S. pneumoniae* RK1235, gelb für *S. pneumoniae* RK1234 und türkis für *S. pneumoniae* RK123 dargestellt.

Diese Untersuchung zeigt, dass die Hemmung der Translation des *comC*-Gens von keiner csRNA alleine bewerkstelligt werden kann. csRNA1 und csRNA2 sind anhand dieser Untersuchung in geringerem Maße an der Regulation beteiligt. csRNA3 kann alleine ebenfalls keine erhebliche Erniedrigung der ComC'- lacZ -Menge auslösen. Interessanterweise sind diese drei csRNAs gemeinsam trotzdem in der Lage die Expression annähernd auf das Level der Expression im Wildtyp zu senken. csRNA4 vermag, gefolgt von csRNA5 alleine die stärkste Hemmung durchzuführen. Diese beiden csRNAs senken die Expression gemeinsam ebenfalls auf die Höhe der Expression im Wildtyp. Zusammenfassend konnte folglich ein additiver Effekt der csRNAs auf die Translation von *comC* aufgedeckt werden. Keine der csRNAs ist alleine für die Regulation verantwortlich, jedoch genügen im Falle von csRNA4 und csRNA5 2 RNAs und im Falle von csRNA1, csRNA2 und csRNA3 3 RNAs um den maximalen Regulationseffekt zu erzielen.

5. Diskussion

5.1 Die CiaRH-regulierten intergenen Promotoren und ihre Transkripte: Die csRNAs

Die CiaRH-regulierten intergenen Promotoren sind stark von CiaR abhängig. Ohne einen funktionstüchtigen Response Regulator ist praktisch keine Expression vorhanden (Halfmann *et al.*, 2007). Die Aktivitäten dieser Promotoren sind in der Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 5.1: Von den CiaRH-regulierten intergenen Promotoren resultierende β -Galaktosidase-aktivitäten

Promotoren	R6 <i>ciaR::aad9</i>	R6 (wt)	R6 <i>ciaHT230P</i>
P _{ccnC}	< 1	1960 ± 310	5157 ± 771
P _{ccnE}	< 1	640 ± 42	998 ± 78
P _{ccnB}	< 1	619 ± 20	3374 ± 335
P _{ccnD}	< 1	587 ± 19	1661 ± 107
P _{ccnA}	< 1	363 ± 26	1669 ± 141

Die durchschnittliche Promotorstärke der 5 intergenen Promotoren im Wildtyp R6 beträgt 833 β -Galaktosidase Units, wogegen die Promotorstärke der anderen 11 CiaRH-regulierten Promotoren bei 142 Units lag (Halfmann Doktorarbeit, 2008). Die höchste Aktivität zeigte der *ccnC*-Promotor, gefolgt von P_{ccnE}, P_{ccnB}, P_{ccnD} und P_{ccnA}. Die Aktivitäten stimmen in ihrem Verhältnis mit den Stärken der detektierten RNA-Banden in den Northern-Blot Analysen überein. csRNA3 und csRNA5 lieferten die stärksten gefärbten Banden. Die Promotoren zeigten während des gesamten Wachstums starke Aktivität und die Northern Blot-Analyse zeigte, dass die csRNAs während des gesamten Wachstums in den Zellen vorhanden sind. Diese Ergebnisse deuten auf eine hohe CiaR-abhängige Expression und Stabilität der csRNAs in den Zellen. Dementsprechend könnte die Erforschung der Rolle der csRNAs bei den CiaRH-assoziierten Phänotypen dazu beitragen, die bisher ungeklärten Verbindungen zwischen CiaRH und der Lyse in der stationären Phase sowie der Kompetenz ans Tageslicht zu bringen.

Nicht nur die starke Promotoraktivität ist allen csRNAs gemeinsam, sondern auch eine hohe Ähnlichkeit und dementsprechend wahrscheinlich auch eine ähnliche Sekundärstruktur. Die immer wiederkehrenden Sequenzmotive in den csRNAs, welche komplementär zu Translations-initiationsregionen (TIRs) von Genen sein können, weisen auf eine mögliche Interaktion mit den TIRs von Zielgen-mRNAs hin. Die Interaktion von kleinen RNAs mit dieser Region von Zielgen-mRNAs führte in den bisher durchgeführten Untersuchungen stets zu einer Inhibition der Translation (Repoila und Darfeuille, 2009). In den meisten Fällen ist die Bildung des kleinen RNA/mRNA-Duplexes gefolgt von dessen Degradation. Die bekanntesten Beispiele solcher regulatorischen Interaktionen sind die

von SgrS/*ptsG* (Kawamoto *et al.*, 2006; Morita *et al.*, 2005), RyhB/*sodB* (Afonyushkin *et al.*, 2005) und OxyS/*rpoS* (Zhang *et al.*, 1998) in *E. coli*, von MICs/OMPs (zusammengefasst in Vogel, 2008) in Enterobakterien, von RNAIII/*spa/rot* in *S. aureus* (Huntzinger *et al.*, 2005) und von Qrr1-4/*hapR* in *V. cholerae* (Lenz *et al.*, 2004).

Die einzelsträngigen ungepaarten Regionen der csRNAs zeigen eine hohe Ähnlichkeit zueinander. Durch die Vernachlässigung der UUUUC-Sequenzeinschübe in csRNA2 und csRNA3 (siehe Abbildung 4.14) und eines zusätzlichen Adenins in csRNA4 konnte ein ungepaarter Bereich von 31 Nukleotiden auf das Vorhandensein einer Konsensussequenz in den csRNAs untersucht werden. Das Alignment dieser Sequenzen zeigt klar und deutlich eine hohe Ähnlichkeit von 23 Nukleotiden in diesem Bereich:



Abbildung 5.1: Konsensussequenz der einzelsträngigen ungepaarten Regionen der csRNAs. Alignment der mittleren ungepaarten Regionen der csRNAs mit WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>).

Aufgrund dieser hohen Ähnlichkeit im mittleren ungepaarten Bereich könnte man schließen, dass die csRNAs alle die gleichen Gene regulieren. Jedoch ist auch vorstellbar, dass die Regulation nicht nur durch die Interaktion in diesem mittleren Bereich erfolgt, sondern dass der erste Stamm der csRNAs ebenfalls involviert ist. Die ersten Stämme werden hauptsächlich durch A/T-Paarungen zusammengehalten, wodurch jedoch keine hohe Stabilität vorhanden ist. Die Energieniveaus der ersten Stämme, mit Ausnahme von csRNA5, befinden sich zwischen -6 bis -9 kcal/mol. Die Bildung der Terminatorstämme führt dagegen zu freien negativen Energien von -13 bis -14 kcal/mol.

Die ersten Stämme zeigen eine hohe Ähnlichkeit, bei csRNA1 und csRNA2 sind sie sogar identisch. Die bereits erwähnten Sequenzmotive, welche zu den TIRs komplementär sein können, sind, mit Ausnahme der csRNA4, auch in den ersten Stämmen zu finden. Bei csRNA5 ist dieses Motiv in einer seitlichen Auswölbung, gefolgt von der langen Sequenzinsertion, welche keine Komplementarität zu den anderen csRNA-Sequenzen aufweist, lokalisiert. Ein Alignment der Sequenzen der ersten Stämme von csRNA1, csRNA2 und csRNA3 ist in Abbildung 5.2 dargestellt.

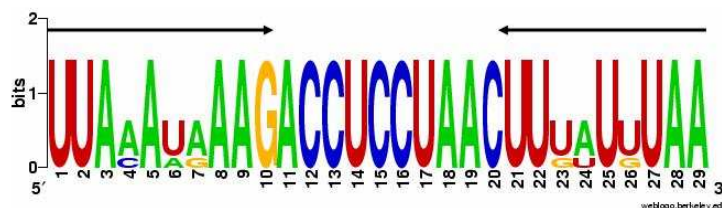


Abbildung 5.2: Konsensussequenz der ersten Stämme der csRNA1-3. Alignment der ersten Stämme mit WebLogo. Die beiden Arme der Stämme wurden mit Pfeilen markiert.

5.2 Strategien zur Auffindung der csRNA Zielgene

Bei der Suche nach den Zielgenen der csRNAs wurden mehrere Methoden angewendet. Die erste Untersuchung mittels Microarrayanalyse brachte leider keine Zielgene ans Tageslicht. Lediglich die Transkriptmengen zweier Regionen wurden signifikant verändert vorgefunden, wobei es sich bei einer dieser Regionen um einen Intergenbereich handelt und keine Erklärung für diese Veränderung gefunden werden konnte. Interessanterweise konnte in RK12345 eine zweifach erniedrigte *comX*-mRNA Menge identifiziert werden. Es konnten keine Hinweise auf eine direkte Interaktion der csRNAs und *comX* gefunden werden. Diese Veränderung steht aber im Einklang mit der beobachteten erniedrigten Transformationseffizienz dieses Stammes. Warum weitere Gene des Kompetenz-Regulons in den Microarrays nicht detektiert werden konnten, bleibt unklar. Eine Erklärung könnte darin liegen, dass die Veränderungen in den Transkriptmengen kleiner Faktor 2 betragen, wodurch eine Detektion erschwert ist. Eine weitere Erklärung könnte in der angewendeten Methodik begründet liegen. Die Microarray-Analysen wurden zu Beginn dieser Arbeit, nach der Konstruktion der csRNA-Inaktivierungsstämme durchgeführt. Hierbei wurde die dafür in unserem Labor etablierte Standardmethode angewendet (McKessar und Hakenbeck, 2007). Das bedeutete, dass sowohl die Vorkulturen der Stämme als auch die zur RNA-Isolation verwendeten Hauptkulturen in C-Medium kultiviert wurden. Während der Analyse der Transformierbarkeit konnte festgestellt werden, dass diese Methode der Stammanzucht eine ständige Transformierbarkeit während des gesamten Wachstums bewirkt. Hierbei waren große Schwankungen in der Höhe der Transformationseffizienz detektierbar und weder die Induktion noch der Abbruch der Transformierbarkeit konnte beobachtet werden.

Um diese Problematik zu umgehen, also die Kompetenzentwicklung von *S. pneumoniae* überhaupt beobachten zu können und die Kompetenztestung zu standardisieren, wurde eine neue Methode zur Anzucht der Stämme eingeführt. Hierbei wurden die Vorkulturen der Stämme in dem die Kompetenz hemmenden THB-Medium angezogen. Diese Vorkulturen werden im folgenden präkompetente Zellen genannt. Die Hauptkulturen wurden weiterhin in C-Medium hergestellt, welches mit präkompetenten Zellen zu einer Dichte von 8×10^6 Zellen/ml angeimpft wurde. Die Verwendung von präkompetenten Zellen zur Testung der Kompetenz ist in der Literatur beschrieben. Beispielsweise werden präkompetente Zellen bei einem niedrigen pH von 6,9 angezogen und zur Inokulation verwendet (Guiral *et al.*, 2006). Bei stets gleichem Inokulum erfolgte die Induktion der Kompetenz mit der neu eingeführten Methode bei annähernd gleicher Zelldichte und es kam zum Abbruch der Transformierbarkeit vor Beginn der stationären Wachstumsphase. Somit eignete sich die Methode sowohl für die Bestimmung von Transformationseffizienzen, als auch für die Messung der Promotoraktivitäten und Translationsstärken der in der Kompetenz involvierten Gene. Die erniedrigte Transformierbarkeit und die erhöhte ComC-Translationsaktivität in RK12345 wurde mit dieser

Methode untersucht. Eine Wiederholung der Microarray-Experimente mit RNA-Präparaten aus mit dieser Methode angezogener Zellen wurde aus Zeitgründen nicht durchgeführt.

Die zweite Methode, eine Analyse der Zellysate auf veränderte Proteinmengen erbrachte ebenfalls kein positives Ergebnis. Die eindimensionale SDS-Gelanalyse ist nicht die üblicherweise verwendete Methode zur Analyse von veränderten Proteinmengen. Die Auflösung der Proteine ist hierbei sehr begrenzt. Im Falle einer starken Regulation ist eine Detektion jedoch vorstellbar, was auch in der Literatur bereits belegt ist (Kalamorz *et al.*, 2007).

Mittels bioinformatischer Analyse konnte eine Zielgenliste von 13 Zielgenen erstellt werden. Die Suche basierte hierbei auf der Komplementarität der csRNAs und der möglichen Zielgene. Als Eingabe bei den Suchen wurden die mittleren ungepaarten Regionen der csRNAs verwendet. Diese Bereiche schienen sich durch die vermutete Sekundärstruktur für eine erste Suche am besten zu eignen. Die TIRs aller annotierten Gene in *S. pneumoniae* R6 wurden nach Komplementarität zu den eingegebenen Sequenzen durchsucht. Hierbei wurden drei verschiedene Programme verwendet und die Suche erfolgte unter Anwendung festgelegter Kriterien. Die Anlegung der beschriebenen Kriterien war angesichts der großen Anzahl möglicher Zielgene notwendig. Die jeweils ersten 20 Zielgene der csRNAs, identifiziert durch das TargetRNA-Program (Tjaden *et al.*, 2006), wurden weiter analysiert. Dies bedeutete 60 verschiedene mögliche Zielgene. Die Berücksichtigung folgender zwei Kriterien schien bei der weiteren Auswahl sinnvoll. Mindestens 2 csRNAs müssen ein Zielgen „treffen“ oder das Zielgen musste sich unter den ersten fünf Zielgenen einer csRNA befinden. Die vorhergesagte Interaktion musste stets mit den TIRs der Zielgene erfolgen. Es hätten können durchaus andere mögliche Interaktionsregionen der Zielgene mit berücksichtigt werden, denn sowohl die Regulation von Zielgenen durch Interaktion mit der kodierenden Region stromabwärts der TIR am 5'-Ende der mRNA (Bouvier *et al.*, 2008), als auch durch Interaktion stromaufwärts der TIR mit der mRNA (Vogel, 2008) wurde in einigen Fällen bereits beschrieben. Die beschriebenen konservierten Sequenzmotive der csRNAs suggerierten jedoch eine wahrscheinlichere Interaktion mit den TIRs.

Anschließend wurde die freie negative Energie der Interaktionskomplexe mit allen csRNAs unter Verwendung des 2-state hybridisation Servers (Zuker, 2003) berechnet und letztendlich alle Zielgene deren Interaktionskomplexe mit mindestens drei csRNAs eine niedrigere freie Energie als -18 kcal/mol bildeten für die Klonierung bestimmt. 11 Zielgene stammen aus den Zielgenlisten, welche durch das TargetRNA-Program gefunden wurden. Ein zusätzliches putatives Zielgen, spr0791, wurde mit der Methode von Mandin *et al.* gefunden (Mandin *et al.*, 2007). Im Fall dieses Gens handelte es sich um eine Komplementarität mit den ersten Stämmen der csRNAs. Damit unterscheidet sich dieses Gen von den anderen Zielgenen in der Art der Interaktion und sollte eine Art Kontrolle sein. Ein weiteres zusätzliches Zielgen, *comA*, wurde nach der Methode von Tafer und Hofacker vorhergesagt und erfüllte ebenfalls die angelegten Kriterien (Tafer und Hofacker, 2008).

Die so erstellte Zielgenliste stellt einen ersten Ansatz dar. Weitere Ermittlungen unter Verwendung anderer Kriterien zur Auffindung von Zielgenen sollten folgen.

5.3 Validierung der csRNA-Zielgene *in vivo*

Bei den 13 bioinformatisch vorhergesagten möglichen Zielgenen sollte mittels Untersuchungen *in vivo* die Regulation durch die csRNAs nachgewiesen werden. Die vorhergesagten interagierenden Abschnitte von 12 dieser Gene konnten in das neu konstruierte Pneumo Translations Probe Plasmid pTP3 kloniert werden. Die klonierten Fragmente beinhalteten die Translationsinitiationsregionen (TIRs) der Gene. Die Klonierung der TIRs von spr1927 war nicht erfolgreich. Möglicherweise stellte die starke Expression dieses Fragments bzw. des Spr1927'-lacZ Fusionsproteins einen Nachteil für die Zellen dar. Unter diesem Selektionsdruck kam es stets zur Instabilität des Plasmids. Die Expression der klonierten Gene wurden, ausgehend von Promotor P_{vegT} , welcher sich auf dem pTP3-Plasmid befindet, gewährleistet. Dieser Promotor ist konstitutiv, unabhängig von CiaR aktiv und folglich auch unabhängig von den csRNAs. Dementsprechend zeigen die erhaltenen β -Galaktosidaseaktivitäten die posttranskriptionelle Regulation der Zielgene.

Die konstruierten Plasmide wurden in das Genom des Wildtypstammes *S. pneumoniae* R6 und von *S. pneumoniae* RK12345 integriert. Bei 4 Konstrukten konnte eine erhöhte Aktivität in Abwesenheit der csRNAs beobachtet werden. Diese Konstrukte enthielten die TIRs von *comC*, spr0081, *cibB* und spr1645. Die Erhöhung der β -Galaktosidaseaktivität zeigte einen Faktor von zwei bis größer drei.

Die mit Hilfe des Translations Probe Plasmids ermittelte posttranskriptionelle Kontrolle von *comC*, spr0081, *cibB* und spr1645 wurde anschließend mit neuen Translationsfusionen überprüft. Hierzu wurden zur Transkription der Fusionsgene die eigenen Promotoren der Gene *comC*, spr0081, *cibB* und spr1645 verwendet. Da mRNAs durch die csRNAs durch Interaktion reguliert werden, ist die relative Menge der Partner zueinander von Interesse. Das Ausmaß der Regulation könnte also durch die Stärke der Promotoren der Zielgene verändert werden.

Ein weiterer Grund, weshalb die beobachteten Regulationen durch neue Fusionen überprüft werden sollten, liegt in der Lage der regulierten Gene begründet. In zwei Fällen, bei *cibB* und spr1645, war die getestete TIR, da diese Gene an der zweiten Position des vorhergesagten Operons lagen, nicht am Anfang der mRNA lokalisiert. Dementsprechend wurde im Translations Probe bei diesen Genen nicht, wie im Fall von *comC* und spr0081, die authentische TIR analysiert, sondern die TIR wurde aus ihrer natürlichen Umgebung herausgelöst. Dies kann im Wesentlichen zweierlei Folgen haben. Erstens könnte die Sekundärstruktur der mRNA verändert werden, zweitens könnte die Translation des ersten Gens im Operon die Regulation des zweiten beeinflussen.

Die posttranskriptionelle Regulation konnte nur bei *comC* und spr0081 bestätigt werden. Beide Gene befinden sich an der ersten Stelle in ihrem Operon. Bei *comC* konnte eine ca. zweifache und bei

spr0081 sogar eine bis zu fünffache negative Regulation, vermittelt durch die csRNAs, festgestellt werden. Die Regulation von spr0081 fiel bei Expression von seinem eigenen Promotor stärker aus als bei der Expression von P_{vegT} . Der Promotor von spr0081 zeigt im Vergleich zu P_{vegT} eine wesentlich geringere Aktivität. Die hier gemessene stärkere, csRNA-vermittelte Regulation zeigt, dass die tatsächliche Regulation bei Expression ausgehend von P_{vegT} sogar unterschätzt werden kann.

cibB und spr1645 sind jeweils die zweiten Gene auf ihren polycistronischen mRNAs. Hier mussten längere Fragmente, welche die gesamte Regionen ab der 5'-Ende der mRNAs beinhalteten, kloniert werden. Die Regulation konnte bei beiden Konstrukten nicht bestätigt werden.

Die Sekundärstruktur der mRNAs könnte bei *cibB* und spr1645 die Interaktion mit den kleinen RNAs verhindern. Es wäre vorstellbar, dass die Sekundärstruktur der mRNA die Interaktionsregion mit den csRNAs „verdeckt“. Bei der Klonierung der kurzen Zielgenregionen in pTP3 sind die eigentlichen Sekundärstrukturen der ganzen mRNA nicht vorhanden und die csRNAs können interagieren und somit regulatorisch wirken. Bei der Klonierung von langen Fragmenten, beginnend ab dem 5'-Ende der mRNAs, kann sich die Sekundärstruktur ausbilden, wodurch die csRNA-Interaktionsstelle auf der mRNA nicht mehr zugänglich ist und die csRNAs keinerlei Regulation mehr ausüben. Um Hinweise auf eine solche Struktur finden zu können, wurden die in pTP3 klonierten kurzen Fragmente von *cibB* und spr1645 mit der Sekundärstruktur der längeren *cibAB*- und spr1646-1645-Fragmente verglichen. Die Faltstruktur der spr1645- und spr1646-1645-Fragmente war im Wesentlichen gleich. Die Interaktionsregion befand sich bei beiden Strukturen in einem vergleichbar aufgebauten Stamm. Das *cibB*-Fragment bildete keine Sekundärstruktur, wogegen sich die Interaktionsregion des *cibAB*-Fragments in einem Stamm befindet. Diese Ergebnisse zeigen, dass keine eindeutigen Hinweise für diese Annahme gefunden werden konnten. Diese Untersuchungen erfolgten jedoch ausschließlich *in silico*, wobei das angewendete mfold-Program ausschließlich eine mögliche Sekundärstruktur von mRNAs anhand vorhandener Komplementaritäten in verschiedenen Bereichen berechnet. Die Auswirkung verschiedener Proteinkomponenten auf die Ausbildung der Sekundärstruktur von mRNAs wird hier nicht berücksichtigt.

Die Hemmung der Interaktion von den csRNAs mit *cibB* und spr1645 könnte möglicherweise auch durch die Translation der stromaufwärts liegenden Gene erfolgen. Hierbei könnten die die Translation ausführenden Ribosomen eine Rolle spielen und praktisch die csRNAs „verdrängen“ oder einfach die Interaktion verhindern.

Die pTP3-Konstrukte der Gene spr0231 und spr0822 wurden mit 1,5-fach als eher gering reguliert vorgefunden (Abbildung 4.30). Beide Gene befinden sich ebenfalls auf polycistronischen mRNAs. spr0231 befindet sich an der dritten Stelle und spr0822 an der vierten im jeweiligen Operon. Wegen der schwachen Regulation in pTP3 und ihrer Lokalisation im Operon wurde auf die Klonierung und die weitere Untersuchung dieser Fragmente verzichtet. Die bei der Untersuchung von *cibB* und spr1645 gesammelten Erfahrungen untermauerten diese Entscheidung.

Um die Rolle der Position des Gens im Operon besser beurteilen zu können, wurden an dieser Stelle 30 verschiedene Zielgene in *E. coli* und *Salmonella* bezüglich ihrer genetischen Organisation anhand der veröffentlichten Genomsequenzen untersucht. Diese Analyse ergab, dass sich nur ein Gen, *galK*, an vierter Stelle seines Operons befand. Alle andere Gene waren die ersten Gene ihren Operons bzw. sie lagen auf monocystronischen mRNAs. Eine allgemeine Aussage über die Lokalisation der Zielgene von kleinen RNAs innerhalb polycistronischer mRNAs kann hieraus sicherlich nicht gefolgert werden, jedoch unterstützt dieses Ergebnis die Annahme, dass die Regulation der ersten Gene durch kleine RNAs effektiver erfolgen kann.

Bei *comC* wurde ein zweifacher negativer Effekt auf die Translation beobachtet und es konnte eine veränderte Promotoraktivität bestätigt werden. Dies zeigt, dass die veränderte Menge an ComC einen Effekt auf die Expression des Promotors hat. Die Aktivierung des *comC*-Promotors erfolgt durch ComE. Dementsprechend muss die veränderte Expression von ComC eine Auswirkung auf ComE haben. Das *comC*-Gen kodiert für das Vorläuferpeptid des Kompetenz-Phäromons CSP. Nachdem eine kritische Zelldichte in einer Kultur erreicht ist, führt die Bindung dieses Oligopeptids an die Histidin Kinase ComD zur Aktivierung einer große Anzahl von Genen und die Zellen treten in die sogenannte X-Phase ein. Die Regulation dieses Gens steht möglicherweise im Zusammenhang mit den phänotypischen Beobachtungen des *ccn*-Deletionsstammes. Diese Beobachtungen, sowie die phänotypischen Auswirkungen der Wechselwirkung von *comC* und den csRNAs, werden in Abschnitt 5.5 diskutiert. Mit der posttranskriptionellen Regulation von *comC* sind die csRNAs an der Regulation einer quorum sensing vermittelten Zellantwort in *S. pneumoniae* beteiligt.

Das zweite regulierte Gen ist *spr0081*. Anhand von Homologievergleichen ist das Spr0081-Protein die Permease eines ABC-transporters, welche in den Transport von Kohlenhydraten involviert sein könnte. Das im Operon nachfolgende Spr0082 ist ebenfalls homolog zu Permeasen. Das dritte Gen *spr0083* könnte für das Substratbindeprotein kodieren. Der Promotor des Operons besitzt ein cre-Element (catabolite responsive element), welches eine Bindestelle für das Katabolit-Kontroll-Protein CcpA darstellt. Untersuchungen an Gram positiven Organismen, wie *Staphylococcus xylosus* (Egeter und Brückner, 1996), *Bacillus subtilis* (Henkin *et al.*, 1991) und *Streptococcus mutans* (Burne *et al.*, 1999), indizierten, dass die cre-abhängige Katabolitrepression weit verbreitet unter den Gram positiven Organismen mit niedrigen GC-Gehalt ist. In der Anwesenheit von PTS-Zuckern wird durch Intermediate der Glykolyse ein weiterer Regulator, die HPr-Kinase, aktiviert. Diese aktiviert CcpA, welche an den cre-Operatoren bindet und reprimiert bzw. aktiviert die Expression des entsprechenden Operons. In Abwesenheit von Glukose findet die Aktivierung von CcpA nicht oder nur in geringen Mengen statt und dementsprechend ist keine oder geringe Regulation vorhanden (zusammengefasst in Deutscher *et al.*, 2006).

Bei Wachstum mit Laktose wurde *spr0081* exprimiert und es konnte eine fünffache posttranskriptionelle Regulation gemessen werden. Welches Kohlenhydrat das Spr0081-0082-0083-

System in *S. pneumoniae* transportiert, bleibt jedoch ungeklärt. Hinweise darauf könnten durch Deletion des Operons und Untersuchung des Wachstums der Mutante mit verschiedenen Kohlenhydraten im Vergleich zum Wildtyp, wie bereits von McKessar und Hakenbeck gezeigt (McKessar und Hakenbeck, 2007), erhalten werden.

Ob die gemessenen Regulationsstärken innerhalb einer zu erwartenden Größenordnung liegen, lässt sich schwer beantworten. Ein Großteil veröffentlichter Zielgene wurde durch die Suche mittels Proteomic-Analyse gefunden, wobei in den meisten Fällen zuerst eine Überexpression der kleinen RNAs erfolgte (Rasmussen *et al.*, 2005; Udekwu *et al.*, 2005; Moller *et al.*, 2002). Die bei der Validierung der Target-Gene mittels LacZ- oder GFP-Fusionen erhaltenen Daten wurden ebenfalls durch Überexpression der kleinen RNAs *in trans* ermittelt (Urban und Vogel, 2007; zusammengefasst in Vogel und Wagner, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden die csRNAs nicht überexprimiert, sondern in ihrer natürlichen Umgebung an ihren Genorten belassen. Ihre regulatorische Wirkung wurde demzufolge wahrscheinlich künstlich nicht vergrößert.

Die Validierung der csRNA Zielgene *in vivo* ergab, dass zwei der 12 untersuchten Gene posttranskriptionell negativ durch die csRNAs reguliert werden. Bei diesen beiden Genen handelt es sich um *comC* und *spr0081*. Anhand der erhaltenen Daten kann in beiden Fällen von einer Hemmung der Translation, vermittelt durch die csRNAs, ausgegangen werden.

5.4 Interaktion der csRNAs mit den mRNAs ihrer Zielgene

Die Analyse der Interaktionssequenzen der untersuchten Zielgene gibt einige Hinweise auf eine mögliche csRNA-Zielgen-Konsensussequenz. Für die im Folgenden beschriebenen Betrachtungen werden alle vier als reguliert vorgefundenen TIRs aus dem ersten Experiment, durchgeführt mit dem Translations Probe pTP3, verwendet. Die Untersuchung der Sequenz dieser Zielgen-mRNAs zeigte folgende Gemeinsamkeiten. Erstens besitzen alle vier mit Hilfe von pTP3 als reguliert gefundenen Zielgen-mRNAs fünf Adenine nach ihrem Startcodon. Diese fünf Adenine finden sich nur bei 2 nichtregulierten Genen.

Zweitens ist eine gemeinsame SD-Konsensussequenz: -GGAG- vorhanden, wobei alle vor dieser Sequenz mindestens drei Adenine oder Thyminen besitzen. Bei *spr0081* ist hier noch ein Guanin zu finden, was möglicherweise eine verstärkte Interaktion mit csRNA4 und csRNA5 bewirkt. Dieses Guanin verstärkt hier wahrscheinlich die Interaktion, scheint aber nicht ausschlaggebend zu sein. Diese Vorstellung wird dadurch unterstützt, dass bei *blpY*, welches die gleiche SD-Sequenz wie *spr0081* besitzt, keinerlei Regulation gemessen werden konnte. Eine weitere Gemeinsamkeit der regulierten Gene besteht in der Basenzusammensetzung zwischen ihrer SD und den Startcodons. Bei *comC* und *spr0081* sind in dieser Region ausschließlich Adenine und Thyminen vorhanden. Bei *cibB*

und spr1645 sind maximal zwei Guanine oder Cytidine vorhanden. Da allerdings diese beiden Gene unter den verwendeten Bedingungen bei Expression vom eigenen Promotor als nicht reguliert erschienen, soll bei der Bestimmung der Zielgen-Interaktions-Konsensussequenz von den Guaninen und Cytidinen abgesehen werden. In den folgenden Tabellen sind die Zielgensequenzen, anhand welcher eine mögliche csRNA- Zielgen-Konsensussequenz erstellt werden konnte, gezeigt. Die Shine-Dalgarno-Sequenzen und die Startcodons wurden rot gedruckt. Blau wurden alle Basen, die nicht mit der Konsensussequenz übereinstimmen, unterlegt. In der Tabelle 5.2 sind die Sequenzen der Gene gezeigt, die eine Regulation durch die csRNAs bei Klonierung in das pTP3 Plasmid gezeigt hatten. In der Tabelle 5.3 sind die hier nicht regulierten Gene gezeigt.

Tabelle 5.2: Sequenzen der regulierten Zielgene und der putativen Konsensussequenz der csRNA-Zielgene.

Sequenzen der interagierenden Region der in pTP3 regulierten Zielgene	Zielgene
TTAGGAGATTTTATTATGAAAAA	-comC
AAGGGAGGAAATTATGAAAAA	-spr0081
TTAGGAGGAGATTAATATGATGAAAAA	-cibB
AAAGGAGAACTTATCATGAAAAA	-spr1645
WWRGGAGR- 6-9 W -ATGAAAAA	Konsensus
W steht für A oder T; R steht für G oder A;	

Tabelle 5.3: Sequenzen der nichtregulierten Zielgene

Sequenzen der interagierenden Region der in pTP3 nicht regulierten Zielgene	Zielgene
AAAGGAGATTTATTATGGCAAA	-spr0231
TTAGGAGATAGGTGATGAAAGA	-spr0265
AAGGGAGATTATCATGATGGACA	-spr0822
TTTGGAGGTGTTATGAAGAA	-spr1610
TTAGGAGGGAGATTATCTATGAAACT	-spr1932
TTAGGAGATTTGATGGAGAA	-spr1992
GAGGGAGGATTTCTATGAAAAA	-blpY
AAAGGAGATGAATATGAAATT	-comA
TAGAGAGGTGGCTGTATGAAAAA	-hsdS

Anhand der untersuchten Sequenzen und der erstellten Konsensussequenz konnte die interagierende Region der csRNAs weiter eingegrenzt werden. Die möglicherweise für die Interaktion ausschlaggebende, zur Zielgen-Konsensussequenz komplementäre Sequenz wurde in Abbildung 5.3 am Beispiel der csRNA4 unterstrichen dargestellt.

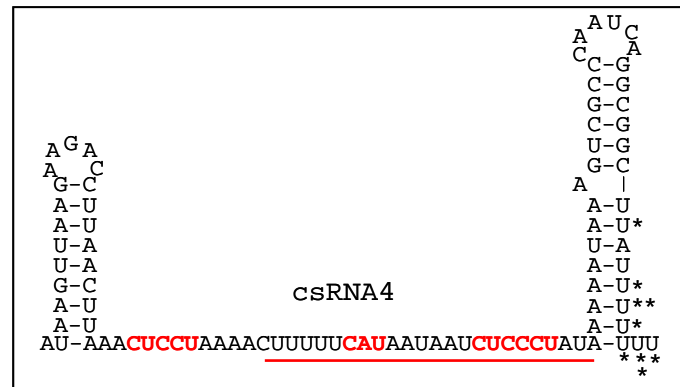


Abbildung 5.3: Die csRNA/Zielgen-Interaktion vermittelnde Sequenz am Beispiel von csRNA4. Die Sekundärstruktur der csRNA4 ist abgebildet. Anti-SD und anti-AUG Motive wurden rot gedruckt. Die interagierende Region wurde rot unterstrichen.

Um die direkte Regulation von *comC* und spr0081 durch die csRNAs zu bestätigen, wurden *in vitro* RNA/RNA Bandshift-Assays durchgeführt. In den durchgeführten Bandshift-Assays wurde auf eine radioaktive Markierung der RNAs verzichtet. Stattdessen wurde eine neue Färbung der RNA mittels CYBRGreenII eingeführt. Durch die Färbung der Gele mit diesem Farbstoff werden sowohl die Zielgen-mRNAs, als auch die kleinen RNAs sichtbar gemacht. Um die Unterschiede der neuen Methodik verdeutlichen zu können, sollen einige Beispiele bezüglich der RNA-Konzentrationen und Verhältnisse der einzelnen RNAs in den Assays beschrieben werden. Im neuen Assay wurde stets 160 nM Zielgen-RNA eingesetzt. Die Menge der csRNAs variierte zwischen 80 nM und 800 nM. Die Interaktionsbanden konnten bereits bei einem Mengenverhältnis von 1:0,5 von Zielgen-RNA zu csRNA beobachtet werden. Bei einem Mengenverhältnis von 1:1 waren klare Banden detektierbar. Bei den Bandshift-Analysen von Mandin *et al.* wird die kleine RNA radioaktiv markiert und in einer Konzentration von <1 nM eingesetzt. Die Zielgen-RNA wurde in einer Konzentration von bis zu 1 µM zugegeben, was einen bis zu tausendfachen Überschuss bedeutet. Interaktionsbanden wurden ab einem zehnfachen Überschuss sichtbar (Mandin *et al.*, 2007). Bei Heidrich *et al.* wurden 5 nM radioaktiv markierte kleine RNA eingesetzt und die Zielgen-RNA-Konzentration betrug maximal 400 nM. Bei 40 nM, was einen achtfachen Überschuss bedeutet, erschien die erste Interaktionsbande.

In der neu eingeführten CYBRGreenII-Bandshift Methode musste die Konzentration der kleinen RNAs wegen der Färbeeigenschaften von CYBRGreen höher eingestellt werden. Eine klare Färbung konnte ab einer RNA-Menge von ca. 80 nM detektiert werden. Verglichen mit den beiden zuvor beschriebenen radioaktiven Assays ist dies eine recht hohe Konzentration an kleinen RNAs im Assay. Andererseits konnten mit dieser Methode bei einem Verhältnis von einem Teil Zielgen-RNA zu einem Teil csRNA bereits starke Interaktionsbanden detektiert werden, was bei der radioaktiven Markierung erst bei einem achtfachen bzw. zehnfachen Überschuss erfolgte. Ein weiterer Vorteil der neuen Methode liegt darin, dass beide interagierenden RNAs sichtbar gemacht werden. Dadurch ist nicht nur

die Bildung der Interaktionsbande sondern auch das Verschwinden der RNAs auf der eigentlichen Laufröhre und nicht zuletzt die Intaktheit der RNAs kontrollierbar.

Die Interaktion der *comC*-mRNA mit allen fünf csRNAs konnte nachgewiesen werden. Die spr0081-mRNA bildete mit allen csRNAs, außer csRNA1, eine Interaktionsbande. Die berechnete Bindungsenergie von csRNA1 und spr0081 lag mit -14 kcal/mol höher als -18 kcal/mol, was als Grenze bei der Zielgenanalyse *in silico* eingesetzt wurde. Die fehlende Interaktion an dieser Stelle bestätigte, dass die angewendete Energiehöhe durchaus in einem angemessenen Bereich lag.

5.5 Zusammenhang zwischen den CiaRH-assoziierten Phänotypen und den csRNAs

Die csRNAs sind die am stärksten durch CiaR regulierten Gene. Die Untersuchung ihres Einflusses bei den CiaRH-assoziierten Phänotypen stand dementsprechend im Mittelpunkt des Interesses. Die Entwicklung der natürlichen genetischen Kompetenz in RK12345 ist im Gegensatz zu *ciaR::aad9* oder dem Wildtyp beeinträchtigt. In diesem Stamm wurde eine bis zu achtfach erniedrigte Transformationseffizienz beobachtet. Eine vorstellbare Erklärung der erniedrigten Transformierbarkeit konnte durch die Deutung der Promotoraktivitäten von *comC* und *cibA* gefunden werden. Der Beginn der Aktivität von P_{comC} in RK12345 erfolgt einen Messpunkt später als im Wildtyp R6. Dieser Messpunkt entspricht einer 20 minütigen Verzögerung. Der Anstieg erfolgt während des gesamten Wachstums bis weit in die stationäre Phase hinein. Unterschiedlich hierzu stellt sich der Sachverhalt im Fall von P_{cibA} dar. Die Expression des Promotors beginnt in beiden Stämmen in etwa zum gleichen Zeitpunkt, danach ist ein steiler Anstieg der Aktivität zu beobachten. Die maximale Aktivität wird bereits bei einer Nephelo von 50 erreicht. Die *comC*-Promotoraktivität hingegen steigt zu diesem Zeitpunkt weiter. Der später einsetzende Anstieg der Promotoraktivität von *comC* um 20 Minuten in der Wachstumsphase könnte das Zeitfenster der transformierbaren Phase verkürzen. Wenn die Abschaltung der Transformierbarkeit durch einen Kompetenz-unabhängigen aber Wachstumsphasen-abhängigen Faktor erfolgen würde, würde dies bedeuten, dass die Abschaltung der Kompetenz in RK12345 zur gleichen Zeit wie in R6 erfolgt.

Somit könnte eine durch die kleinen RNAs vermittelte Verkürzung der transformierbaren Phase die erniedrigte Transformierbarkeit erklären. Gegen diese Theorie spricht die Tatsache, dass auch bei einer durch Zugabe von CSP künstlich hervorgerufenen transformierbaren Phase es nach kurzer Zeit zum Abbruch der Transformierbarkeit kommt (Martin *et al.*, 2000). Dies ist ein Hinweis darauf, dass unter diesen Bedingungen für die Abschaltung der Kompetenz ein Kompetenz-abhängiger Faktor verantwortlich ist. Die vorliegenden Untersuchungen wurden jedoch unter anderen Bedingungen durchgeführt. Es wurde kein künstliches CSP verwendet, sondern die Entwicklung der kompetenten Phase in ihrer natürlichen, quorum sensing-vermittelten Form, abgewartet. Dass die Wachstumsphase eine Rolle bei der natürlichen Entwicklung der Kompetenz spielt, wurde bereits im Jahre 1954 gezeigt

(Hotchkiss, 1954). Unter gleichen Bedingungen, wie etwa gleichem pH zu Beginn des Wachstums und gleicher Mediumszusammensetzung, tritt diese Phase immer bei gleicher Zelldichte ein (Chen und Morrison, 1987). Daraus resultiert, dass ein Wachstumsphasen-abhängiger Abbruch der transformierbaren Phase nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann.

Eine zweite Theorie über die Entstehung des Kompetenz-Phänotyps des RK12345-Stammes kann anhand der vorhandenen Literatur ebenfalls aufgestellt werden.

Als Ausgangspunkt dieser Erklärung dient hier erneut die verspätete Induktion des P_{comC} in RK12345. Ohne die Aktivierung durch den Response Regulator ComE ist dieser Promotor inaktiv. Die verspätete Induktion von P_{comC} deutet darauf hin, dass die kleinen RNAs einen Effekt auf die Expression oder den Phosphorylierungszustand von ComE ausüben. Die in Abschnitt 4.8.3 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass in Abwesenheit der csRNAs die Translation der *comC*-mRNA bis zu zweifach erhöht erfolgen kann. Da sich *comC* mit *comD* und *comE* in einem Operon befinden, könnte zumindest theoretisch von einer ebenfalls erhöhten Expression dieser Gene ausgegangen werden. *comC* und *comD* sind im Genom durch 20 Basen voneinander getrennt und *comD* scheint eine eigene Shine Dalgarno-Sequenz zu besitzen. Bei *comD* und *comE* ist eine Überlappung von 4 Basen vorhanden. Dies deutet auf eine voneinander unabhängige Translation von *comC* und *comD* aber eine mögliche translationelle Kopplung von *comD* und *comE* hin. Um die erhöhte Expression von *comD* und *comE* erklären zu können, müsste die Annahme gemacht werden, dass durch das Fehlen der csRNAs die *comCDE* mRNA-Stabilität erhöht ist. Obwohl der primäre Effekt der kleinen RNAs auch nur in der Inhibierung der Translationsinitiation bestehen kann (Morita *et al.*, 2006), kommt es, wie bereits erwähnt, in den meisten Fällen zum Abbau der Komplexes. Das würde in diesem Fall bedeuten, dass durch die Bindung der kleinen RNAs an die TIR von *comC* die Translation von *comC* reprimiert wird und gleichzeitig ein Abbau der mRNA erfolgt. Die Degradation könnte durch RNase III über den Abbau der Doppelstränge der csRNAs und Zielgen-mRNAs initiiert werden (Huntzinger *et al.*, 2005). Die Bildung eines Ribonukleotid-Komplexes mit RNase E, kleinen regulatorischen RNAs und Helferproteinen wie Hfq, wird als ein vorstellbarer Mechanismus bei Gram negativen Organismen, durch welchen kleine RNAs ihre Zielgen-mRNAs destabilisieren, postuliert (Morita *et al.*, 2005). In *B. subtilis* konnte eine 5'-3' Exoribonuklease-Aktivität, vermittelt durch RNase J1 nachgewiesen werden. Hier wurde gezeigt, dass die Bindung der 30S-ribosomalen Untereinheit an die SD-Sequenz der mRNA vor dem Abbau der gesamten mRNA schützt (Mathy *et al.*, 2007).

Die oben beschriebene Annahme, dass die mRNA-Stabilität der *comCDE*-mRNA durch die csRNAs beeinträchtigt ist, könnte mittels Northern Blot-Analysen untersucht werden.

Durch das Fehlen der csRNAs in RK12345 erfolgt keine Interaktion mit der *comCDE*-mRNA und dementsprechend ist vor Beginn der kompetenten Phase ein erhöhtes *comCDE*-Basallevel in den Zellen vorhanden. Die Prozessierungs- und Transportgeschwindigkeit von CSP durch ComAB bleibt jedoch während dieser Zeit unverändert. Es konnte gezeigt werden, dass ComAB den limitierenden Faktor vor und zu Beginn der Kompetenzinitiation darstellt. Eine Überexpression von ComAB führte

zu einer Überexpression von ComCDE, was durch die erhöhte CSP-Prozessierung und den Export vermittelt wurde (Martin *et al.*, 2000). Der Export von CSP bleibt also unverändert und es entsteht ein Ungleichgewicht zwischen dem exportierten CSP und der ComDE-Menge in den Zellen, es ist also wenig CSP im Vergleich zu viel ComDE vorhanden. Dadurch könnte die Phosphorylierung von ComE durch ComD nicht oder nicht in entsprechendem Maß erfolgen. Eine höhere Menge an unphosphoryliertem ComE in den Zellen könnte so einen negativen Effekt auf die Kompetenz bewirken. Bei dieser Theorie müsste also davon ausgegangen werden, dass die erniedrigte Transformierbarkeit von RK12345 nicht durch erhöht translatiertes *comC* verursacht wird, sondern dass die erhöhte Menge an ComD und ComE die wesentliche Rolle spielt. Um die Menge an ComD und ComE untersuchen zu können, sollten zuerst die entsprechenden Antikörper hergestellt werden. In einer anschließenden Western-Analyse sollte die Annahme, dass in RK12345 eine erhöhte ComDE-Menge vorhanden ist, nachgeprüft werden.

Das Phänomen, dass die Transformierbarkeit durch erhöhte *comCDE*-Expression negativ beeinträchtigt wird, wurde bereits beschrieben (Guiral *et al.*, 2006). In dieser Untersuchung wird eine Punktmutation in der Terminatorstruktur einer tRNA stromaufwärts des *comCDE*-Operons beschrieben, welche die Terminatorstruktur destabilisiert. Dadurch kommt es zum Durchlesen durch die RNA-Polymerase und zur Erhöhung des *comCDE*-Basallevels. Die Erwartung einer erhöhten Transformierbarkeit dieses Stammes durch erhöhte *comCDE*-Expression konnte jedoch nicht bestätigt werden. Im Gegenteil konnte ein Abfall der Transformationseffizienz beobachtet werden. Es wurde gezeigt, dass dieser Effekt durch die Überexpression von ComDE hervorgerufen wird und dass die gleichzeitige Überexpression von ComAB und ComDE wieder einen normalen Transformationsphänotyp herstellt (Guiral *et al.*, 2006).

Ähnlich kann die Situation des *comCDE*-Operons und *comAB*-Operons in RK12345 beschrieben werden. Es ist keinerlei Veränderung der *comAB*-Expression vorhanden. Gleichzeitig könnte von einer erhöhten Expression von ComCDE, vermittelt durch das Fehlen der csRNAs, ausgegangen werden. Hierdurch entsteht das bereits beschriebene Ungleichgewicht, also extrazellulär weniger CSP im Vergleich zu viel ComDE.

Die durch die vermehrte ComDE-Menge hervorgerufene Erniedrigung der Transformationseffizienz könnte durch zwei verschiedene Theorien erklärt werden. Erstens könnte die erhöhte Menge an ComD in der Cytoplasmamembran dazu führen, dass sich zwei mit CSP-assoziierte ComD-Monomere für die Bildung eines Dimers mit geringerer Wahrscheinlichkeit finden, als im Wildtyp. Da die Dimerisierung von Histidin Kinasen dieses Typs zur aktiven Konformation führt (Mascher *et al.*, 2006), wäre die geringere Transformationseffizienz somit erklärbar. Zweitens und zudem leichter vorstellbar ist die Annahme, dass ComE in unphosphoryliertem Zustand einen negativen Effekt auf die Transformierbarkeit ausübt (Guiral *et al.*, 2006). Eine Grundlage dafür, dass ComE in unphosphorylierten Zustand einen negativen Effekt auf die Kompetenz ausüben könnte, liefert die Beobachtung, dass dieses Protein lange nach der Abschaltung der Kompetenz in den Zellextrakten

mittels Western-Analyse detektiert werden konnte (Ween *et al.*, 1999). Ganz im Gegensatz hierzu ist die ComE-abhängige Expression von *comX*, dem Regulator der späten Kompetenzgene, in den ersten 10 Minuten nach der Induktion der Kompetenz auf maximalem Niveau, wonach ein rascher Abfall der mRNA-Menge folgt (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Dies bedeutet, dass bereits nach 10 Minuten keine nennenswerte Aktivierung der *comX*-Transkription mehr erfolgt, obwohl ComE noch vorhanden ist. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass ComE bereits nach kurzer Zeit unphosphoryliert vorliegt. Die Ursache hierfür ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Bisher konnte für den Abbruch der Transformierbarkeit, wie bereits erwähnt, keine Erklärung gefunden werden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen ComE und diesem Phänomen wird immer wieder in Erwägung gezogen. Außerdem wird dem Response Regulator ComE eine Rolle bei der Kolonisation des Wirts und bei der Säure-induzierten Lyse zugesprochen (Kowalko und Sebert, 2008; Pinás *et al.*, 2008).

S. pneumoniae R6 *ciaR::aad9* zeigt eine unveränderte Transformationseffizienz in C-Medium, ähnlich dem Wildtyp R6. In diesem Stamm ist das gesamte CiaRH-Regulon inaktiv und es ist nur noch eine geringe Menge an csRNA3 vorhanden (siehe Abbildung 4.4). Würde der CiaRH-vermittelte Einfluss auf die Kompetenz alleine durch die csRNAs hervorgerufen werden, müsste in diesem Stamm eine ähnlich erniedrigte Transformationseffizienz messbar sein. Die Beteiligung eines weiteren Gens des CiaRH-Regulons an der Kompetenz wurde bereits gezeigt. Hierbei handelt es sich um *htrA*. Der Einfluss weiterer CiaRH-regulierte Gene auf die Kompetenz kann bisher nicht ausgeschlossen werden. Untersuchung zur Aufklärung dieses Sachverhalts werden momentan durchgeführt. Die bisher veröffentlichten Daten geben kein einheitliches Bild über den Zusammenhang von *htrA* und der Kompetenz. Es wurde einerseits von einer Abnahme der Transformierbarkeit der *htrA*-Deletionsmutante (Ibrahim *et al.*, 2004) und andererseits von unveränderter Transformierbarkeit (Sebert *et al.*, 2005) im Wildtyphintergrund berichtet. In THB-Medium soll *htrA* keinen Einfluss auf die Kompetenz haben. Die Zellen bleiben weiterhin nicht transformierbar (Sebert *et al.*, 2005), wogegen nach Inaktivierung von *htrA* durch Konstruktion eines Minigens von der Rückkehr der Transformierbarkeit in THB-Medium berichtet wurde (Schäfer, 2007). Diese teilweise widersprüchlichen Resultate können nur durch die unterschiedlichen Konstruktionen und die dadurch vermittelten polaren Effekten auf das stromabwärts von *htrA* liegende *parB* erklärt werden. Um ein klares Bild über die Funktion von *htrA* in der Kompetenz zu bekommen, wurde ein *htrA*-Deletionsstamm konstruiert, der nachweislich keinen Einfluss auf die stromabwärts liegenden Gene ausübt. Die Untersuchung dieses Stammes bezüglich der Transformierbarkeit zeigte eindeutig, dass *htrA* in engem Zusammenhang mit der Kompetenz steht und einen negativen Effekt ausübt (Miriam Müller, persönliche Mitteilung). Dieser Deletionsstamm ist in Kompetenz-hemmendem THB-Medium wieder transformierbar. In C-Medium, in welchem *S. pneumoniae* Kompetenz zeigt, ist jedoch keine wesentliche Veränderung der Transformierbarkeit zu beobachten.

Die Frage, wie HtrA diesen Effekt ausübt, bleibt bisher noch ungeklärt. Die Lokalisierung von HtrA an der Oberfläche der Zellen führt zu der Theorie, dass HtrA CSP abbauen könnte. Diese Theorie wurde in einem Experiment untersucht, wodurch sie jedoch weder nachhaltig widerlegt noch bewiesen werden konnte (Sebert *et al.*, 2005). Eine weitere Möglichkeit wäre eine Interaktion von HtrA und ComD, welches sich in der Membran befindet. Ein Abbau von ComD durch HtrA konnte ebenfalls nicht festgestellt werden (Sebert *et al.*, 2005). Die Regulation eines weiteren, bisher unbekannten und mit der frühen Kompetenz assoziierten Proteins durch HtrA konnte ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Der molekulare Interaktionsmechanismus zwischen HtrA und der Kompetenz bleibt also vorerst unklar.

Der unterschiedliche Kompetenzphänotyp von RK12345 und R6 *ciaR::aad9* lässt sich durch die Beteiligung von HtrA und/oder eines weiteren CiaRH-regulierten Gens an der Regulation erklären. In RK12345 werden alle Gene des CiaRH-Regulons, außer die csRNAs, exprimiert und die entsprechenden Gene, wie *htrA*, können ihren negativen Effekt auf die Kompetenz ausüben. Würden wir von einem Abbau des CSP durch HtrA ausgehen, würde dies bedeuten, dass das bereits vorhandene Ungleichgewicht zwischen ComCDE und ComAB durch den Abbau von CSP außerhalb der Zelle weiter verstärkt und die Aktivierung durch CSP nur verzögert eintreten kann. In R6 *ciaR::aad9* sind im Gegensatz zu RK12345 alle CiaRH-regulierten Gene inaktiv. Somit entfällt der negative Effekt von HtrA und eventuell weiteren CiaRH-regulierten Genen auf die Kompetenz.

Zusammengefasst könnte folgende Theorie zur Wechselwirkung der kleinen RNAs und weiterer CiaRH-regulierter Gene mit der Kompetenz aufgestellt werden: Sowohl in RK12345 als auch R6 *ciaR::aad9* fehlen die csRNAs und es kommt zu einer erhöhten Expression von ComCDE. Die Expression von ComAB ist jedoch in beiden Stämmen unverändert. Dadurch kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen ComAB und ComCDE, was bedeutet, dass die Menge an prä-CSP, ComD und ComE erhöht gegenüber der Menge von ComA und ComB ist. Die erhöhte Menge an prä-CSP kann nicht in höheren Mengen prozessiert und exportiert werden. Dementsprechend wird, wie auch im Wildtyp, in beiden Fällen gleich viel CSP exportiert. HtrA und eventuell noch ein weiteres CiaRH-reguliertes Gen üben in RK12345 ihre negativen Effekte auf die Kompetenz aus, was eventuell durch den CSP-Abbau vermittelt wird. Dementsprechend kann in RK12345 das wenige CSP nicht in genügendem Maß ComD aktivieren, wodurch auch die Phosphorylierung von ComE in diesem Stamm nicht in ausreichender Menge erfolgen kann. Das unphosphorylierte ComE wirkt negativ auf die Kompetenz und es ist eine erniedrigte Transformierbarkeit zu beobachten. In R6 *ciaR::aad9* werden dagegen die negativ wirkenden CiaRH-abhängigen Gene nicht exprimiert und dementsprechend das CSP nicht abgebaut. Folglich kann das CSP in ausreichender Menge ComD aktivieren, wodurch ComE phosphoryliert werden kann. Das phosphorylierte ComE aktiviert die frühen Kompetenzgene

und die Zellen treten in die kompetente Phase ein. Das in Abbildung 5.4 dargestellte Modell soll die beschriebenen Interaktionen verdeutlichen.

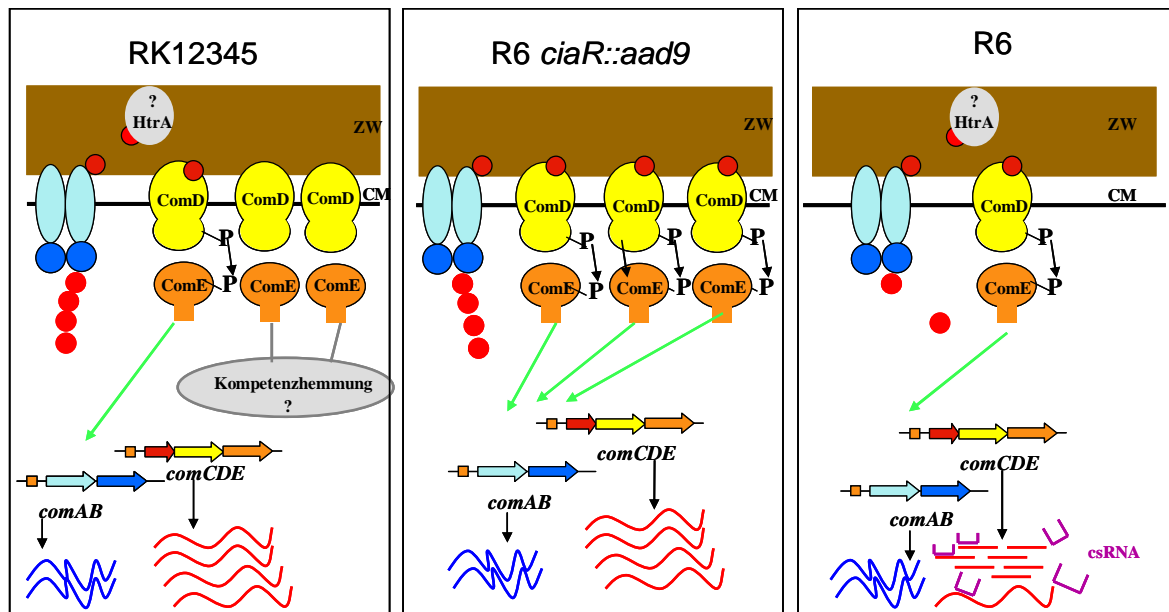


Abbildung 5.4: Modell zur Wechselwirkung der csRNAs und HtrA mit den frühen Kompetenzgenen und ihren Genprodukten. Die Situation in RK12345, R6 *ciaR::aad9* und im R6 Wildtyp sind gezeigt. In RK12345 und R6 *ciaR::aad9* kommt es durch das Fehlen der csRNAs zur erhöhten Menge an ComCDE. Die Menge an exportiertem, prozessiertem CSP bleibt dagegen unverändert. In RK12345 baut möglicherweise HtrA CSP ab, wodurch die CSP-Menge extrazellulär verringert wird. Dementsprechend kann ComD nicht in ausreichender Menge aktiviert werden und ComE bleibt größtenteils unphosphoryliert. Das unphosphorylierte ComE hemmt die Kompetenzentwicklung. In R6 *ciaR::aad9* fehlt HtrA und das CSP kann ComD aktivieren und die Zellen werden kompetent. Im Wildtyp führen die csRNAs ihren negativen Effekt auf die Translation von ComCDE aus, wodurch möglicherweise ein Gleichgewicht zwischen ComCDE und ComAB hergestellt wird. Die mRNA von *comAB* wurde blau und von *comCDE* rot dargestellt. Das CSP wurde rot und die csRNAs lila dargestellt. Die Zellmembran wurde mit CM und die Zellwand mit ZW abgekürzt.

Die eigentliche Funktion der kleinen RNAs im Wildtyp R6 könnte die Herstellung des Gleichgewichts zwischen ComCDE und ComAB sein. Die Untersuchung der Promotoraktivität von P_{comC} ergab eine maximale β -Galaktosidaseaktivität von 700 Units. Der *comA*-Promotor besitzt dagegen eine Expressionsstärke von maximal 150 Units (unpublizierte Daten). Dies besagt, dass im Wildtyp bereits ein Ungleichgewicht zwischen der mRNA von *comAB* und *comCDE* vorhanden ist. Durch die Interaktion der kleinen RNAs und der *comCDE*-mRNA könnte es, wie bereits postuliert, nicht nur zur Hemmung der Translation sondern auch zur Destabilisierung der mRNA kommen. Dies würde die Menge von ComCDE verringern und dadurch einen Zustand des Gleichgewichts zwischen ComAB und ComCDE hervorrufen.

Mit dem in Abbildung 5.4 dargestellten Model kann der erniedrigte Kompetenzphänotyp des Stammes RK12345 gut erklärt werden. Grundlage der aufgeführten Erklärung bietet die erhöhte Expression von ComCDE in diesem Stamm. In Abschnitt 4.10 wurde eine Untersuchung der Auswirkung einzelner

csRNAs auf die Translation von *comC* beschrieben. Hier konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von ComC in den Stämmen RK123 und RK45 ähnlich wie im Wildtyp verhält (Abbildung 4.41). Die Transformationseffizienz beider Stämme ist jedoch viel niedriger als im Wildtyp (Abbildung 4.24). Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der Transformierbarkeit durch die csRNAs noch komplizierter erfolgt als angenommen und dass hierbei möglicherweise weitere csRNA-Zielgene beteiligt sind.

Ein Zusammenhang zwischen dem CiaRH-abhängigen Lyseverhalten von *S. pneumoniae* R6 in der stationären Phase und den kleinen RNAs konnte ebenfalls hergestellt werden. Die Analyse des Stammes RK45, in welchem *ccnD* und *ccnE* inaktiviert wurden, zeigte, dass diese beide kleinen RNAs eine Rolle bei der Lyse in der stationären Phase spielen. Der Stamm R6 *ciaR::aad9* mit inaktiviertem CiaR, in welchem nahezu das gesamte CiaRH-Regulon ausfällt, zeigt eine schnelle Autolyse in der stationären Wachstumsphase (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Die Lyse ist hier nicht nur schneller, sondern sie tritt zudem verfrüht ein. Die Einzeldelationen von *ccnD* oder *ccnE*, welche für csRNA4 und 5 kodieren, führen ebenfalls zu einer erhöhten Lyseaktivität. Die Lyse dieser Stämme beginnt später als in R6 *ciaR::aad9*, unterscheidet sich jedoch erheblich durch ihre höhere Lyseaktivität von der Lyse des Wildtyps R6 oder der Stämme mit inaktiviertem *ccnA*, *ccnB* oder *ccnC*. Die gemeinsame Inaktivierung beider Gene *ccnD* und *ccnE* führt zu einer noch stärker erhöhten Lyseaktivität als in den Einzeldelationen von *ccnD* und *ccnE*. Das Lyseverhalten dieses Stammes unterscheidet sich nicht wesentlich von dem des Stammes, in welchem alle csRNA-Gene *ccnABCDE* deletiert wurden. Durch die Inaktivierung der csRNA1, csRNA2 und csRNA3 ist dementsprechend kein noch stärkerer Effekt auf die Lyse zu beobachten. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass die Einzeldelationen von *ccnA*, *ccnB* und *ccnD* keinerlei Effekt auf das Lyseverhalten in der stationären Phase hatten, zeigt eindeutig, dass diese drei csRNAs keine Rolle in der Lyse spielen. Der Lyseeffekt des Stammes RK12345 wird folglich durch den additiven Effekt der Wirkung von csRNA4 und csRNA5 verursacht.

Die wichtigsten autolytischen Enzyme in *S. pneumoniae* sind die Amidase LytA und das Lysozym LytC. Die Expression von *lytC* erfolgt durch den Hauptsigmafaktor des σ^{70} -Typs, wogegen *lytA* einen Promotor sowohl für den σ^{70} -Typ als auch für den alternativen Sigmafaktor σ^x besitzt (Claverys *et al.*, 2007). Eine direkte Wechselwirkung der csRNAs mit *lytA* wurde mittels quantitativer realtime RT-PCR-Analyse untersucht. Sollte die erhöhte Lyserate durch eine veränderte Menge an LytA verursacht werden, könnte eine veränderte Menge der *lytA*-mRNA einen Hinweis geben. Durch diese Untersuchung konnte jedoch keine Erklärung dieses Phänotyp erhalten werden: Die mRNA-Menge von *lytA* war unverändert. Eine Regulation durch die kleinen RNAs, welche ausschließlich auf die Translation der LytA oder LytC Proteine Einfluss nimmt, wäre ebenfalls vorstellbar. Um diese Regulation durchführen zu können, müsste nach heutigen Vorstellungen eine gewisse Komplementarität zwischen den kleinen RNAs und der *lytA*- oder *lytC*-mRNA vorhanden sein. Die Untersuchung der Sequenzen ergab keine Hinweise auf eine solche Regulation. Dementsprechend

basiert der csRNA-vermittelte Lyseeffekt höchstwahrscheinlich nicht auf einer direkten Beeinflussung der *lyt-A* und *lytC*- Translation.

Wie bereits erwähnt, ist der Lyseeffekt in der stationären Phase bei Deletion von *ciaR* höher als bei Deletion der Gene für csRNA4 und csRNA5. Hieraus lässt sich der Schluss ziehen, dass noch weitere CiaRH-regulierte Genprodukte eine Rolle spielen müssen. Die Autolyse in der stationären Phase ist ein komplexes Phänomen, von dem gezeigt wurde, dass es auch von der Kompetenzentwicklung mit beeinflusst wird. Die CSP-induzierte DNA-Freisetzung ins Medium erreicht ihr Maximum in der stationären Phase, wenn die Zellen nicht mehr kompetent sind (Moscoso und Claverys, 2004).

5.6 Ähnliche Effekte und Mechanismen in anderen Organismen

Die Beobachtung, dass mehrere kleine RNAs die Expression eines Gens regulieren können ist nicht ohne Beispiel. Die vier Qrr-RNAs in *V. cholerae* bzw. 5 Qrr-RNAs in *V. harveyi* sind die am besten untersuchten Beispiele hierfür. In *E. coli* ist die Regulation eines Gens durch mehrere RNAs ebenfalls bekannt. Z.B. wird *ompA* durch MicA und RseX oder *pmpC* durch MicC und RseX reguliert (zusammengefasst in Vogel und Papenfort, 2006).

Eine Rolle von kleinen RNAs in der quorum sensing-vermittelten bakteriellen Zell-Zell Kommunikation konnte in *Vibrio* Spezies ebenfalls beobachtet werden. Die Qrr-RNAs von *V. cholerae* und *V. harveyi* unterliegen selbst der quorum sensing-vermittelten Regulation (Lenz *et al.*, 2004). Diese Organismen benutzen zwei bzw. drei verschiedene Signalmoleküle, um die Expression der Gene der Biolumineszenz, der Virulenz oder Biofilm-Formation zu kontrollieren. Bei niedrigen Zelldichten wirken die Sensoren der Signalmoleküle als Kinasen und der LuxO-Regulator wird phosphoryliert. Phosphoryliertes LuxO aktiviert die Expression der kleinen RNAs, welche die Master-Regulatoren HapR im Falle von *V. cholerae* bzw. LuxR in *V. harveyi* posttranskriptionell regulieren. Unter diesen Umständen werden HapR und LuxR nicht synthetisiert und die Gene, welche von HapR bzw. LuxR reprimiert werden, exprimiert. Bei hohen Zelldichten, in Anwesenheit der Signalmoleküle, wirken die Sensoren als Phosphatasen und die Expression der kleinen RNAs bleibt aus, wodurch die beiden Regulatoren HapR und LuxR produziert werden und ihre Aufgabe erfüllen können. Interessanterweise sind auch hier mehrere kleine RNAs an der Regulation eines Gens beteiligt. Im Falle von *V. cholerae* 4 und bei *V. harveyi* 5 kleine RNAs. Bei *V. harveyi* konnte ein additiver Effekt der kleinen RNAs, wie auch bei den csRNAs in *S. pneumoniae*, bestimmt werden. In *V. cholerae* dagegen ist von einem funktionell redundanten Effekt der kleinen RNAs auszugehen (Lenz *et al.*, 2004; Tu und Bassler, 2006).

Die posttranskriptionelle Regulation durch kleine RNAs einiger für den Kohlenhydrat-Metabolismus wichtiger Enzyme ist in einigen Fällen ebenfalls bekannt. Die Gene des Metabolismus werden auf verschiedenen Ebenen reguliert, damit in der Zelle durch den Abbau der Kohlenhydrate keine Akkumulation bestimmter Produkte erfolgt, bzw. damit alle anderen Prozesse der Zelle ablaufen können. Es konnte gezeigt werden, dass bei Vorhandensein von Glukose im Medium die kleine RNA Spot42 die Synthese der Galaktokinase GalK hemmt. Eine weitere kleine RNA, SgrS reprimiert die Synthese des Glukose-Transporters PtsG (EII^{Glc}) und verhindert die weitere Aufnahme von Glukose, wenn Glukose-6-Phosphat zu toxischen Konzentrationen in der Zelle akkumuliert. Die GlmYZ-sRNAs hemmen die Glukosamin-6-Phosphat-Synthetase GlmS und werden durch deren Produkt, das Glukosamin-6-Phosphat aktiviert.

Für viele trans-kodierte RNAs in *E. coli* und *S. typhimurium* wurde gezeigt, dass sie das RNA-Chaperon Hfq als Cofaktor benötigen, um regulatorisch wirken zu können. Dieses Protein ist als pleiotroper Regulator vieler Gene beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Hfq an einzelsträngige RNA-Bereiche der mRNAs aber auch kleinen regulatorischen RNAs mit einer Präferenz für A/U-reiche Sequenzen bindet: *ompA*-mRNA (Moll *et al.*, 2003), DsrA (Brescia *et al.*, 2003) und OxyS (Zhang *et al.*, 2002). Regulatorische Mechanismen mittels kleiner RNAs ohne eine Involvierung von Hfq sind bei *B. subtilis*, *S. aureus*, *C. trachomatis*, *L. monocytogenes* aber auch in *E. coli* bekannt. Bekannte Beispiele hierfür sind die RNA III in *S. aureus* (Huntzinger *et al.*, 2005), die Rli-ncRNAs in *L. monocytogenes* (Mandin *et al.*, 2007) und SR1 in *B. subtilis* (Heidrich *et al.*, 2006). Das Hfq ist in Streptokokken nicht vorhanden und ein homologes Protein konnte durch Blast-Analyse ebenfalls nicht gefunden werden. Eine Wechselwirkung der csRNAs mit einem anderen möglichen Helfer-Protein kann nicht ausgeschlossen werden.

Einen Hinweis darauf, dass die csRNAs ohne ein Helferprotein regulieren könnten, gibt die neu entdeckte kleine RNA VrrA in *Vibrio cholerae*. Diese besitzt eine den csRNAs stark ähnelnde Sekundärstruktur: Ein 37 Nukleotide langer einzelsträngiger Bereich ist umrahmt durch zwei Stem-Loop Strukturen. Der ungepaarte Bereich beinhaltet ein CUCCU- und ein UCCU anti-SD Motiv. Es wurde gezeigt, dass VrrA unabhängig von Hfq sein Zielgen *ompA* reguliert (Song *et al.*, 2008). Mittels Toeprint-Analyse wurde gezeigt, dass VrrA die Bindung der 30S-Untereinheit des Ribosoms an die Ribosomenbindestelle der *ompA*-mRNA verhindert. VrrA und die Translationsinitiationsregion der *ompA*-mRNA besitzen einen komplementären Bereich von 22 Nukleotiden wobei die Hemmung der Translationsinitiation höchstwahrscheinlich durch die Interaktion dieser Bereiche erfolgt. Die interagierende Region von VrrA ist in Abbildung 5.5 rot umrandet.

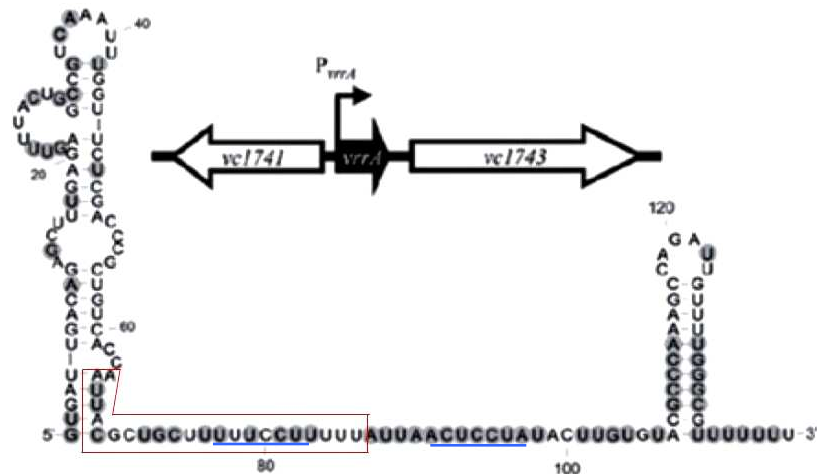


Abbildung 5.5: Den csRNAs stark ähnelnde Sekundärstruktur von VrrA aus *V. cholerae* (Song *et al.*, 2008). Die möglichen anti-SD Sequenzen wurden blau unterstrichen. Die mit dem Zielgen *ompA* interagierende Region wurde rot umrandet.

5.7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Identifizierung und initiale Charakterisierung von fünf kleinen regulatorischen RNAs innerhalb des CiaRH-Regulons. Die nun vorliegenden Daten ermöglichen eine erste Vorstellung über die Zusammenhänge der kleinen RNAs und den mit dem CiaRH-System in Verbindung stehenden Phänotypen. Die vorgestellten Daten geben einen ersten Einblick in die Komplexität dieser Wechselwirkung und die daraus resultierenden Effekte.

Detaillierte Folgeuntersuchungen zur Interaktion der csRNAs mit dem *comC*-Gen sollten die Rolle der csRNAs in der Regulation der genetischen Kompetenz in *S. pneumoniae* aufklären. Hierbei könnte die Untersuchung der csRNA-abhängigen mRNA-Stabilität von *comCDE* mittels Northern-Analyse und die Bestimmung der Menge an ComDE mittels Western-Analyse den vermuteten Zusammenhang aufklären. Um jedoch ein klares Gesamtbild über die Auswirkung von CiaRH auf die Transformierbarkeit von *S. pneumoniae* zu bekommen, ist möglicherweise die Aufklärung der Rolle von weiteren CiaRH-regulierten Genen in der Entwicklung der genetischen Kompetenz notwendig. Die Untersuchung des zweiten regulierten Gens, spr0081, sollte weitere Hinweise auf die Rolle der csRNAs und somit auch des CiaRH-Systems im Kohlenhydrat-Metabolismus in *S. pneumoniae* erbringen.

Durch die Aufdeckung weiterer, an der Interaktion beteiligter Faktoren sollte die Regulationsweise der ersten kleinen RNAs von *S. pneummoniae* besser verstanden werden. Hierbei sollte nach einer Hfq-ähnlichen Proteinkomponente gesucht werden. Eine Möglichkeit für diese Analyse würde eine Transposon-Mutagenese darstellen. Die Selektion der erwünschten Klone könnte hierbei mit einigen Schwierigkeiten verbunden sein. Einerseits ist hierbei die geringe Koloniegröße von *S. pneumoniae*

aber auch die relativ geringe Regulation durch die csRNAs der bisher identifizierten Zielgene von Nachteil. Jedoch könnte die Regulation durch die csRNAs vor einem Hintergrund mit aktiviertem CiaRH-System möglicherweise stärker ausfallen und dadurch die Selektion erleichtert werden. Hierzu würde sich aufgrund der erhöhten Aktivität der CiaR-abhängigen Promotoren der *S. pneumoniae* *ciaH*^{C306}-Stamm eignen. Allerdings konnte in diesem Stamm eine hohe genetische Instabilität beobachtet werden (Miriam Müller, persönliche Mitteilung). Eine Untersuchung verschiedener CiaH-Allele zur Auffindung einer hoch aktiven und stabilen CiaH-Mutante wird bereits durchgeführt.

Eine andere Methode zur Auffindung eines möglichen Helferproteins könnte auf der Wechselwirkung von csRNAs und dem Helferprotein basieren. Diese Methode wird eher zum „Fischen“ von kleinen RNAs mittels eines bekannten Proteins wie Hfq angewendet, jedoch ist der umgekehrte Vorgang ebenfalls bekannt. Chant und Summers beschreiben eine solche Methode. Hierbei wird die RNA in einer sehr hohen Konzentration an Sepharose gebunden und mit Gesamzelllysat inkubiert (Chant und Summers, 2007). Diese Methode könnte jedoch wegen geringer Ausbeute und falsch positiver Ergebnisse ebenfalls einige Schwierigkeiten bereiten (Vogel und Wagner, 2007).

Nicht zuletzt stellt die bioinformatische Suche nach weiteren csRNA-Zielgenen unter Anwendung anderer Kriterien einen wichtigen Punkt unter den weiterführenden Untersuchungen dar. Hierbei könnte bei der Suche sowohl eine andere mögliche Interaktionsregion der csRNAs aber auch andere Regionen der Zielgen-mRNAs eingesetzt werden.

6. Literaturverzeichnis

Argaman L, Altuvia S. (2000). *fhfA* repression by OxyS RNA: kissing complex formation at two sites results in a stable antisense-target RNA complex. *J. Mol. Biol.* 300(5):1101-1112.

Argaman, L., Hershberg, R., Vogel, J., Bejerano, G., Wagner, E. G., Margalit, H. and Altuvia, S. (2001). Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr. Biol.* 11 (12): 941-50.

Avery, O. T., MacLeod, C. M. and McCarthy, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus typeIII. *J. Exp. Med.* 79: 137-158.

Babitzke, P., Romeo, T. (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* 10(2):156-163.

Birnboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 7: 1513-1542

Bouvier, M., Sharma, C.M., Mika, F., Nierhaus, K.H., Vogel, J. (2008). Small RNA binding to 5' mRNA coding region inhibits translational initiation. *Mol Cell.* 32(6):827-837.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254

Brantl, S. (2007). Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* 10(2):102-109.

Brescia C. C., Mikulecky P. J., Feig A. L., Sledjeski D. D. (2003). Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA.* 9(1): 33–43.

Burne, R.A., Wen, Z.T., Chen, Y-Y. M., Penders J.E.C. (1999). Regulation of Expression of the Fructan Hydrolase Gene of *Streptococcus mutans* GS-5 by Induction and Carbon Catabolite Repression. *J. Bacteriol.* 181(9): 2863–2871.

Chant, E.L., Summers, D.K. (2007). Indole signalling contributes to the stable maintenance of *Escherichia coli* multicopy plasmids. *Mol Microbiol.* 63(1):35-43.

Chen, J.D., Morrison, D.A. (1987). Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* 133(7):1959-1967.

Claverys, J. P., Havarstein, L. S. (2002). Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Biosci.* 7: 1798-814.

Claverys, J. P., Prudhomme, M., Martin, B. (2006). Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 451-75.

Claverys, J.P., Martin, B., Havarstein, L.S. (2007). Competence-induced fratricide in streptococci. *Mol. Microbiol.* 64(6):1423-1433.

Coleman, J., Green, P.J., Inouye, M. (1984). The use of RNAs complementary to specific mRNAs to regulate the expression of individual bacterial genes. *Cell* 37(2):429-436.

- Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Hénard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B., Wells, J., Claverys, J. P. (2004).** Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of *ciaR* mutant cells. *Mol. Microbiol.* 51 (4):1071-86.
- Deutscher, J., Francke, C., Postma, P.W. (2006).** How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70(4): 939–1031.
- Egeter, O., Brückner, R. (1996).** Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *Mol. Microbiol.* 21(4):739-749.
- Fischer, W. (1994).** Lipoteichoic acids and lipoglycans. In: Bacterial Cell Wall, Ghuysen, J. M. and Hakenbeck, R., eds. Elsevier Science B.V., Amsterdam. pp. 199-215.
- Fränkel, A. (1886A).** Die Mikrokokken der Pneumoniae. Zeitschrift für klinische Medizin, Berlin, 10:426-449. *Zeitschrift für klinische Medizin*, Berlin, 11:437-458.
- Fränkel, A. (1886B).** Bakteriologische Mitteilungen. *Zeitschrift für klinische Medizin*, 10:401-461.
- García, J. L., Sánchez-Puelles, J. M., García, P., López, R., Ronda, C., García, E. (1986).** Molecular characterization of an autolysin-defective mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137 (2): 614-9.
- García, J. L., García, E., López, R. (1987).** Overproduction and rapid purification of the amidase of *Streptococcus pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* 149 (1): 52-6.
- Geisinger, E., Adhikari, R.P., Jin, R., Ross, H.F., Novick, R.P. (2006)** Inhibition of *rot* translation by RNAIII, a key feature of *agr* function. *Mol. Microbiol.* 61(4):1038-1048.
- Griffith, F. (1928).** The significance of pneumococcus types. *J. Hyg.* 27: 113-159.
- Guenzi, E., Gasc, A. M., Hakenbeck, R. (1994).** A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 12: 505-515.
- Guenzi, E., Gasc, A.M., Sicard, M.A., Hakenbeck, R. (1994).** A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 12(3):505-515
- Guiral, S., Mitchell, T. J., Martin, B., Claverys, J. P. (2005).** Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 102 (24): 8401-2.
- Guiral, S., Hénard, V., Granadel, C., Martin, B., Claverys, J.P. (2006).** Inhibition of competence development in *Streptococcus pneumoniae* by increased basal-level expression of the ComDE two-component regulatory system. *Microbiology.* 152(Pt 2):323-331.
- Halfmann, A., Hakenbeck, R. and Brückner, R. (2007a).** A new integrative reporter plasmid for *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 268: 217-224.
- Halfmann, A., Kovács, M., Hakenbeck, R. and Brückner, R. (2007).** Identification of the genes directly controlled by the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae*: five out of 15 promoters drive expression of small non-coding RNAs. *Mol. Microbiol.* 66 (1): 110-126.

- Halfmann, A. (2008).** Identifizierung des Regulons des Zwei-Komponenten Systems CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Håvarstein, L. S., Coomaraswamy, G., Morrison, D. A. (1995).** An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92** (24): 11140-4.
- Håvarstein, L. S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C. and Claverys, J. P. (2006).** New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol. Microbiol.* **59** (4): 1297-307.
- Heidrich, N., Chinali, A., Gerth, U., Brantl, S. (2006).** The small untranslated RNA SR1 from the *Bacillus subtilis* genome is involved in the regulation of arginine catabolism. *Mol. Microbiol.* **62**(2):520-36.
- Heintz, M. (2006).** Das Zwei Komponenten System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae* : Globale Transkriptomanalysen und phänotypische Charakterisierungen. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Henkin, T.M., Grundy, F.J., Nicholson, W.L., Chambliss, G.H. (1991).** Catabolite repression of alpha-amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a trans-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacl* and *galR* repressors. *Mol. Microbiol.* **5**(3):575-584.
- Höltje, J.V., Tomasz, A. (1976).** Purification of the pneumococcal N-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J. Biol. Chem.* **251**(14):4199-4207.
- Hoskins, J., Alborn, W. E. Jr., Arnold, J., Blaszcak, L. C., Burgett, S., DeHoff, B. S., Estrem, S. T., Fritz, L., Fu, D. J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J. S., Khoja, H., Kraft, A. R., Lagace, R. E., LeBlanc, D. J., Lee, L. N., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S. M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C. W., Nicas, T. I., Norris, F. H., O'Gara, M., Peery, R. B., Robertson, G. T., Rockey, P., Sun, P. M., Winkler, M. E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C.A., Baltz, R. H., Jaskunas, S. R., Rosteck, P. R. Jr., Skatrud, P. L., Glass, J. I. (2001).** Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* **183**(19): 5709-17.
- Hotchkiss, R.D. (1954).** Cyclical behavior in pneumococcal growth and transformability occasioned by environmental changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **40**(2): 49–55.
- Huntzinger E., Boisset S., Saveanu C., Benito Y., Geissmann T., Namane A., Lina G., Etienne J., Ehresmann B., Ehresmann C., Jacquier A., Vandenesch F., Romby P. (2005).** *Staphylococcus aureus* RNAIII and the endoribonuclease III coordinately regulate *spa* gene expression. *EMBO J.* **24**(4):824-35.
- Ibrahim, Y.M., Kerr, A.R., McCluskey, J., Mitchell, T.J. (2004).** Role of HtrA in the virulence and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **72**(6):3584-3591.
- Jacob, F., Monod, J. (1961).** Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* **3**: 318-56.
- Janzon, L., Arvidson, S. (1990).** The role of the delta-lysin gene (*hld*) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *EMBO J.* **9**(5):1391-1399.
- Johnsborg, O., Eldholm, V., Håvarstein, L.S. (2007).** Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res. Microbiol.* **158**(10):767-778.

- Kalamorz, F., Reichenbach, B., März, W., Rak, B., Görke, B. (2007).** Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlmS expression depends on the small RNA GlmZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 65(6):1518-1533.
- Kovács, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R. Brückner, R. (2006).** A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of d-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 188 (16): 5797-5805.
- Kowalko, J.E., Sebert M.E. (2008).** The *Streptococcus pneumoniae* Competence Regulatory System Influences Respiratory Tract Colonization. *Infect. Immun.* 76(7): 3131–3140.
- Kreikemeyer, B., Boyle, M.D., Buttaro, B.A., Heinemann, M., Podbielski, A. (2001).** Group A streptococcal growth phase-associated virulence factor regulation by a novel operon (Fas) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule. *Mol. Microbiol.* 39(2):392-406.
- Lacks, S., Hotchkiss, R. D. (1960).** A study of the genetic material determining an enzyme in *Pneumococcus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 39: 508-18.
- Laible, G., Hakenbeck, R. (1987).** Penicillin-binding proteins in β -lactam-resistant laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 1 (3): 355-363.
- Lange, R., Wagner, C., de Saizieu, A., Flint, N., Molnos, J., Stieger, M., Caspers, P., Kamber, M., Keck, W., Amrein, K. E. (1999).** Domain organization and molecular characterization of 13 two-component systems identified by genome sequencing of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* 237 (1): 223-234.
- LeBlanc, D. J., Lee, L. N., Inamine, J.M. (1991).** Cloning and nucleotide base sequence analysis of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35 (9): 1804-1810.
- Lenz, D.H., Mok, K.C., Lilley ,B.N., Kulkarni, R.V., Wingreen, N.S., Bassler B.L. (2004).** The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell.* 118(1):69-82.
- Locher, K. P. (2004).** Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14 (4): 426-431.
- Maes, M., Messens, E. (1992).** Phenol as grinding material in RNA preparations. *Nucleic Acids Res.* 20 (16): 4374.
- Mandin, P., Repoila, F., Vergassola, M., Geissmann, T., Cossart P. (2007).** Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 35(3): 962–974.
- Mangold, M., Siller, M., Roppenser, B., Vlamincx, B.J., Penfound, T.A., Klein, R., Novak, R., Novick, R.P., Charpentier, E. (2004).** Synthesis of group A streptococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Mol Microbiol.* 53(5):1515-1527.
- Marmur, J. (1961).** A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* 3: 202-218.

- Martin, B., Alloing, G., Méjean, V., Claverys, J.P. (1987).** Constitutive expression of erythromycin resistance mediated by the *ermAM* determinant of plasmid pAM beta 1 results from deletion of 5' leader peptide sequences. *Plasmid*. 18 (3): 250-253.
- Martin, B., Prudhomme, M., Alloing, G., Granadel, C., Claverys, J.P. (2000).** Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 38(4):867-878.
- Mascher, T., Zähler, D., Merai, M., Balmelle, N., de Saizieu, A.B., Hakenbeck, R. (2003).** The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J. Bacteriol.* 185 (1): 60-70.
- Mascher, T., Heintz, M., Zähler, D., Merai, M., Hakenbeck, R. (2006a).** The CiaRH System of *Streptococcus pneumoniae* Prevents Lysis during Stress Induced by Treatment with Cell Wall Inhibitors and by Mutations in *pbp2x* Involved in β -Lactam Resistance. *J. Bacteriol.* 188 (5): 1959-1968.
- Mascher, T., Helmann, J.D., Uden G. (2006).** Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70(4): 910–938.
- Massé, E., Vanderpool, C.K. and Gottesman, S. (2005).** Effect of RyhB Small RNA on Global Iron Use in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187(20): 6962–6971.
- McKessar, S. J., Hakenbeck, R. (2007).** The two-component regulatory system TCS08 is involved in cellobiose metabolism of *Streptococcus pneumoniae* R6. *J. Bacteriol.* 189 (4): 1342-50.
- Meister, G., Tuschl, T. (2004).** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 431(7006):343-349.
- Merai, M. (2003).** Analyse von Zielgenen des Zwei Komponenten Systems CiaRH aus *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Moll I., Afonyushkin T., Vytvytska O., Kabardin V. R., Bläsi U. (2003).** Coincident Hfq binding and RNase E cleavage sites on mRNA and small regulatory RNAs. *RNA*. 9(11): 1308–1314.
- Møller, T., Franch, T., Højrup, P., Keene, D.R., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., Valentin-Hansen P. (2002).** Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol. Cell*. 9(1):23-30.
- Morita, T., Maki, K., Aiba, H. (2005).** RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev.* 19(18):2176-2186.
- Morita, T., Mochizuki, Y., Aiba, H. (2006).** Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 103(13):4858-4863
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50.
- Newton, C. R., Graham, A. (1994).** PCR. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2. Aufl., Heidelberg.

- Novick, R.P. (2003).** Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol. Microbiol.* 48(6):1429-1449.
- Ottolenghi, E., Hotchkiss, R. D. (1962).** Release of genetic transformation agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration. *J. Exp. Med.* 116 (4): 491-519.
- Pasteur, L., Chamberland, C., Roux, E., Thuillier, L. (1881).** Sur la rage. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, Paris, 92: 1259-1260.
- Paterson, G. K., Blue, C. E., Mitchell, T. J. (2006).** Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Med. Microb.* 55: 355–363
- Peterson, S. N., Sung, C. K., Cline, R., Desai, B. V., Snedrud, E.C., Luo, P., Walling, J., Li, H., Mintz, M., Tsegaye, G., Burr, P. C., Do, Y., Ahn, S., Gilbert, J., Fleischmann, R. D. Morrison, D. A. (2004).** Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Mol. Microbiol.* 51 (4): 1051-70.
- Pinás, G.E., Cortes, P.R., Orio, A.G., Echenique, J. (2008).** Acidic stress induces autolysis by a CSP-independent ComE pathway in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 154(Pt 5):1300-8
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., Claverys, J.P. (2006).** Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science*. 313(5783):89-92.
- Quentin, Y. and Fichant, G. (2000).** ABCdb: an ABC transporter database. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2 (4): 501-4.
- Rasmussen, A.A., Eriksen, M., Gilany, K., Udesen, C., Franch, T., Petersen, C., Valentin-Hansen, P. (2005).** Regulation of ompA mRNA stability: the role of a small regulatory RNA in growth phase-dependent control. *Mol. Microbiol.* 58(5):1421-1429.
- Roberts, S.A., Scott, J.R. (2007).** RivR and the small RNA RivX: the missing links between the CovR regulatory cascade and the Mga regulon. *Mol. Microbiol.* 66(6):1506-1522.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K.B. Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239 (4839): 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning, a laboratory manual (2nd ed.), CSH Press, New York.
- Schäfer, F. (2007).** Das Zwei-Komponenten System CiaRH von *Streptococcus pneumoniae*: Der Einfluss der CiaRH regulierten Gene auf die genetischen Kompetenz. Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.
- Sebert, M. E., Palmer, L. M., Rosenberg, M., Weiser, J. N. (2002).** Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* 70 (8): 4059-67.
- Sebert, M. E., Patel, K. P., Plotnick, M., Weiser J. N. (2005)** Pneumococcal HtrA Protease Mediates Inhibition of Competence by the CiaRH Two-Component Signaling System. *J Bacteriol.* 187(12): 3969–3979.

- Shine, J., Dalgarno, L. (1974).** The 3'-Terminal Sequence of *Escherichia coli* 16S Ribosomal RNA: Complementarity to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 71(4): 1342–1346.
- Sicard, A. M. (1964).** A New Synthetic Medium for *Diplococcus pneumoniae*, and its Use for the Study of Reciprocal Transformations at the AmiA Locus. *Genetics* 50: 31-44.
- Silvaggi, J.M., Perkins, J.B., Losick, R. (2005).** Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 187(19):6641-6650.
- Song, J. H., Ko, K. S., Lee, J. Y., Baek, J. Y., Oh, W. S., Yoon, H. S., Jeong, J. Y., Chun, J. (2005).** Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. *Mol. Cells.* 19 (3): 365-74.
- Song, T., Mika, F., Lindmark, B., Liu, Z., Schild, S., Bishop, A., Zhu J., Camilli, A., Johansson, J., Vogel, J., Wai, S.N. (2008).** A new *Vibrio cholerae* sRNA modulates colonization and affects release of outer membrane vesicles. *Mol Microbiol.* 70(1):100-11.
- Steinmoen, H., Teigen, A., Håvarstein, L. S. (2003).** Competence-induced cells of *Streptococcus pneumoniae* lyse competence-deficient cells of the same strain during cocultivation. *J. Bacteriol.* 185: 7176-7183.
- Sternberg, G. M. (1882).** A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. Johns Hopkins University. *Studies from the biological laboratory*, 2 (2): 183-200.
- Sung, C.K., Li, H., Claverys, J. P., Morrison, D. A. (2001).** An *rpsL* cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (11): 5190-5196.
- Sung, C.K., Morrison, D.A. (2005).** Two distinct functions of ComW in stabilization and activation of the alternative sigma factor ComX in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 187(9):3052-3061.
- Tafer, H., Hofacker, I.L. (2008).** RNAplex: a fast tool for RNA-RNA interaction search. (2008). *Bioinformatics.* 24(22):2657-2663.
- Tettelin, H., Nelson, K. E., Paulsen, I. T., Eisen, J. A., Read, T. D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R. T., Haft, D. H., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Peterson, J. D., Umayam, L. A., White, O., Salzberg, S. L., Lewis, M. R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A. M., Utterback, T. R., Hansen, C. L., McDonald, L. A., Feldblyum, T. V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E. K., Holt, I. E., Loftus, B. J., Yang, F., Smith, H. O., Venter, J. C., Dougherty, B. A., Morrison, D. A., Hollingshead, S. K., Fraser, C. M. (2001).** Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science.* 293 (5529): 498-506.
- Throup, J. P., Koretke, K. K., Bryant, A. P., Ingraham, K. A., Chalker, A. F., Ge, Y., Marra, A., Wallis, N. G., Brown, J. R., Holmes, D. J., Rosenberg, M., Burnham, M. K. R. (2000).** A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 35: 566–576.
- Tillet, W. S., Goebel, W. F., Avery, O. T. (1930).** Chemical and immunological properties of a species-specific carbohydrate of pneumococci. *J. Exp. Med.* 52: 895-900.
- Tjaden, B., Goodwin, S.S., Opdyke, J.A., Guillier, M., Fu, D.X., Gottesman, S., Storz, G. (2006).** Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Res.* 34(9):2791-2802.

- Tomasz, A., Hotchkiss R.D. (1964).** Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 51:480-487.
- Tomasz, A., Albino, A., Zanati, E. (1970).** Multiple Antibiotic Resistance in a Bacterium with Suppressed Autolytic System. *Nature* 227: 138-140.
- Tu, K.C., Bassler, B.L. (2007).** Multiple small RNAs act additively to integrate sensory information and control quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Genes Dev.* 21(2):221-33.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M., Udesen, C. (2004).** The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol. Microbiol.* 51(6):1525-1533.
- Vogel, J. (2008).** A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* 71(1):1-11.
- Vogel, J., Papenfort, K. (2006).** Small non-coding RNAs and the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Microbiol.* 9(6):605-11.
- Vogel, J., Wagner, E.G. (2007).** Target identification of small noncoding RNAs in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 10(3):262-70.
- Ween, O., Gaustad, P., Håvarstein, L.S. (1999).** Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 33(4):817-827.
- Weichselbaum, A. (1886).** Über die Ätiologie der acuten Lungen- und Rippenfellentzündungen. *Wiener Medizinische Jahrbücher*, (Alte Folge); 82: 483-554.
- Worhunsky, D.J., Godek, K., Litsch, S., Schlax, P.J. (2003).** Interactions of the non-coding RNA DsrA and RpoS mRNA with the 30 S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* 278(18):15815-15824.
- Xu, P., Alves, J.M., Kitten, T., Brown, A., Chen, Z., Ozaki, L.S., Manque, P., Ge, X., Serrano, M.G., Puiu, D., Hendricks, S., Wang, Y., Chaplin, M.D., Akan, D., Paik, S., Peterson, D.L., Macrina, F.L., Buck, G.A. (2007).** Genome of the Opportunistic Pathogen *Streptococcus sanguinis*. *J. Bacteriol.* 189(8): 3166–3175.
- Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, P., Speed, T. P. (2001).** Normalization for cDNA microarray data. In *Microarrays: optical technologies and informatics*. Volume 4266, Edited by: Bittner, M., Chen, Y., Dorsel, A., Dougherty, E. R. San Jose, CA, USA: SPIE: 2001: 141-152.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985).** Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33 (1):103-19.
- Zähner, D. (1999).** Identifizierung von Zielgenen des signaltransduzierenden Zweikomponentensystems *cia* von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation, Technische Universität Kaiserslautern.
- Zähner, D., Kaminski, K., van der Linden, M., Mascher, T., Merai, M., Hakenbeck, R. (2002).** The *ciaR/ciaH* regulatory network of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4: 211-216.
- Zhang, A., Wassarman, K.M., Ortega, J., Steven, A.C., Storz, G. (2002).** The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol. Cell.* 9(1):11-22.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3406-3415.

Udekwu, K.I., Darfeuille, F., Vogel, J., Reimegård, J., Holmqvist, E., Wagner, E.G. (2005). Hfq-dependent regulation of OmpA synthesis is mediated by an antisense RNA. *Genes Dev.* 19(19):2355-2366.

Urban, J.H., Vogel J. (2007). Translational control and target recognition by *Escherichia coli* small RNAs *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* 35(3): 1018–1037.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Márta Kovács
geboren am: 19.03.1977 in Tirgu Mures, Rumänien
Familienstand: Verheiratet
Staatsangehörigkeit: Rumänisch
Muttersprache: Ungarisch

Schulbildung

1983-1987 Grundschole, Gaiesti, Rumänien
1987-1991 Mittelschule, Valeni, Rumänien
1991-1996 Gymnasium Mihai Eminescu, Tirgu Mures; Rumänien
Abschluss: Abitur

1997-1998 Au-Pair, Neunkirchen Saar

Hochschulbildung

1998-1999 Studienkolleg, Universität des Saarlandes
Abschluss: Prüfung zur Feststellung der Eignung ausländischer Studienbewerber für die Aufnahme eines Studiums an Hochschulen der Bundesrepublik Deutschland
1999-2005 Biologiestudium, Technische Universität Kaiserslautern
Hauptfach: Mikrobiologie
Abschluss: Diplom
Thema: Das *dlt* Operon in *Streptococcus pneumoniae*: Expression und Funktion der Genprodukte beim Einbau von D-Alanin in Teichonsäuren.

Promotion

2005-2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiterin in der Abteilung Mikrobiologie der Technischen Universität Kaiserslautern zur Zwecke der Promotion.
Thema der Promotion: Die kleinen nichtkodierenden RNAs im Regulon des Zwei-Komponenten Systems CiaRH in *Streptococcus pneumoniae*.

Danken möchte ich an dieser Stelle:

Frau Prof. Dr. Regine Hakenbeck für die herzliche Aufnahme in ihrer Abteilung, die Vergabe des Themas und die ständige Unterstützung!

Herrn Prof. Dr. Matthias Hahn für die Bereitschaft zur Übernahme des Promotionsvorsitzes sowie Herrn Prof. Dr. John A. Cullum für die Übernahme der Zweitkorrektur!

Meinem Betreuer Herrn PD Dr. Reinhold Brückner danke ich für eine tolle Zusammenarbeit mit vielen Gesprächen, die mir nicht nur im Fachlichen den Blick in die richtige Richtung führten. Danke dafür, dass er mir dieses tolle Thema anvertraut hat und vor allem für seine alles hinterfragenden Diskussionen!

Sven, Maribel und Hakim aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stadler in Leipzig für die bioinformatische Unterstützung bei der Zielsuche und die gute Zusammenarbeit!

Ganz besonderen Dank an die lieben Laborkollegen und Wegbegleiter der letzten drei bis vier Jahre: Dalia, Petra, Alex und Carsten! Ich möchte euch auch als den besten Teilnehmern der lustigen Perfekten-Dinner-Runde danken! Möge eure Freude am Kochen weiter wachsen und eure Rezepte stets besser werden!

Danke den Bürokolleginnen Katja und Tina, die während des Schreibens dieser Arbeit stets Interesse an meinem Vorankommen zeigten!

Für Miriam - die neue Herrin der β -Galaktosidase! Danke für die HtrA-Ergebnisse, die ich hier erwähnen durfte!

Irma danke ich für ihre einzigartige, mitreissende Art das Leben zu genießen!

Danke an meinen ehemaligen Kollegen Manuel, den ich als erstes im Labor 136 getroffen habe und von dem ich einige pfiffige Kniffe, die den Laboralltag erleichtern, lernen durfte.

Allen Mitarbeiter und Ehemaligen der Abteilung für eine schöne Zeit!

Ein besonderen Dank meinem Ehemann Carsten für die Unterstützung und die geduldige Korrektur unvorstellbar falscher deutscher Grammatik.
